

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Papel de la endocitosis mediada por clatrina
en el desarrollo y viabilidad celular en la
retina de *Drosophila melanogaster*.**

TESIS DOCTORAL

SUSANA PERALTA MORALES

Madrid, 2007

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Papel de la endocitosis mediada por clatrina
en el desarrollo y viabilidad celular en la
retina de *Drosophila melanogaster*.**

Memoria que presenta para optar al grado de
doctor, la licenciada en Biología
Susana Peralta Morales

Director: **Dr. Javier Vinós Gómez de Balugera**
Investigador contratado

Departamento de Bioquímica/
Instituto de Investigaciones Biomédicas
UAM/CSIC

Esta tesis ha sido realizada gracias a la concesión de la beca FPI-2001-1561 del Ministerio de Educación y Ciencia, asociada al proyecto BFI2001-3887.

A mis padres

Agradecimientos

Por fin estoy escribiendo este apartado, lo cual significa que ya he terminado de escribir la tesis. Pero para llegar a este punto han sido necesarias muchas personas...porque este es un trabajo de equipo.

En primer lugar quiero dar mil gracias a mis padres que me han dado la vida. Gracias papis por todo el amor que he recibido, gracias por la educación no sólo académica sino moral que me habéis proporcionado, por el cariño, los valores y por todo, porque yo soy como soy gracias a vosotros. Os quiero mucho!

A mi director de tesis, Javier Vinós, quiero agradecerle la oportunidad que me ha brindado de introducirme en el mundo de la ciencia. He aprendido mucho a tu lado, a plantear e interpretar los experimentos, mucha genética de moscas y ya no digamos en el tema bio-informático. En resumen gracias por todos los conocimientos adquiridos. Y ¡Vivan los Mac! Ah, también ha sido un placer trabajar con la mosquita, así que gracias *Drosophila*, eres muy dócil, y tienes un gran potencial, sigue así.

Muchas gracias también a Margarita Cervera, siempre me he sentido como uno de tus “chicos”. Desde el principio nos acogiste con los brazos abiertos y nos has dado todo el apoyo necesario. Eres una excelente persona, y mejor científica. Gracias por el apoyo, por tu interés y por tus consejos científicos y no científicos.

Mil gracias también a Marcos González-Gaitán por acogerme en su laboratorio en Dresde, por todo lo que he aprendido y me ha estimulado, y por su interés personal en este trabajo. Ha sido una gran oportunidad para mi formación la realización de esta estancia breve y se lo agradezco profundamente. Además gracias por la oportunidad de haber conocido una de las ciudades más bonitas de Europa.

También quería agradecerle a Carmen Arribas, mi jefa del primer laboratorio donde estuve trabajando, por todo lo que me ha enseñado y el esfuerzo que me dedicó. Fue un placer trabajar contigo, al igual que con el resto del grupo, Ara, Manuel Ros, Jose Carrascosa, Antonio, Carmen...etc. Gracias a mis compis de Toledo, que gente tan maja, especialmente a Susana “Recas”, paisana mía por una temporada, quiero darles las gracias por todos los momentos compartidos.

Muchas gracias a Roberto Marco, por el interés mostrado, por el apoyo y por compartir tu espacio con nosotros.

A mi compi Yoli, quiero agradecerle su trabajo y dedicación, tantas disecciones realizadas, tantas horas de microscopio.., si nos hubiéramos hecho cirujanas ya estaríamos forradas,, je je! ¿Cuántos años trabajando codo a codo?, tres o cuatro, en los que el número de moscas a cuidar a aumentado mucho ¿verdad?. Bueno, creo que somos un buen equipo. Te deseo lo mejor para el futuro. Muchas gracias por todo y sobre todo por aguantar mi mal humor!

A mi Reichel, Raquel 1, la Dra Marco Ferreres, primero te deseo todo lo mejor en esta nueva aventura que vas a comenzar, aunque no la necesitas, porque tu lo vales. Gracias por todo chatina, un placer trabajar contigo, gracias por todas las sugerencias y consejos, eres la mejor resolviendo los problemas científicos. Gracias por ayudarme con la tesis,

aunque estés liada siempre encuentras el hueco. Además gracias por todos los momentos vividos fuera del labo, amiga, te quiero mucho.

La Cristi que maja, gracias también por ayudarme con la tesis, eres genial, me alegro de que te vaya bien. Ha sido un placer compartir lugar de trabajo contigo, tú nos pones firmes a todos. No cambies, te quiero mucho. Ah y gracias por la visita a Alemania, que bien que lo pasamos, eh!

A R2 o chamita para los amigos, que buen fichaje, no sabe nada el Juanito! Me alegra mucho que estés aquí, y decirte gracias por todo y mil besos. Ah, gracias por apuntarte al baloncesto.....

Gracias a Juan”A” rredondo, je je por tu interés científico y personal, no cambies nunca eres auténtico, mil besos. Igualmente a Jose y a Jorge ,,,, por vuestras simpatía y ayuda prestada (y por esas merendolas). Bueno en general a mi primer labo, B-18, gracias a todos, Jose, Jorge, Juan, Raquel 1, Raquel 2, Elena, Vanesa, Yoli, Vero... por todos los momentos vividos, esas meriendas...esas risas...esos cumpleaños y fiestas de guardar....

Gracias a “La Vane”, “La Vero” y “La Yoli”: sois geniales, cada una tan distinta y tan auténtica.

A mi segundo labo, B-20, muchas gracias también: Carlos por todo lo que me has ayudado con la tesis y también por todo lo demás; a Aida; a Luisja (agujereando eres el mejor) muchas gracias por todo y a Yoli otra vez.

A Jesús , Chema, Belén Prados y Mega-Roiz, compañeros de fatigas,,,,gracias por todas las risas y ánimo¡

A los labos vecinos, B-19 y B-17, también quería daros las gracias por vuestra simpatía y cooperación y por las barbacoas veraniegas: Cristi, Vero, Pablo, Pili, Emiliano, Alvaro, Rosana, Belén, Lucía, Paula, Esther, Miguel, Rafa, Belén Prados (muchacha suerte en tu nueva etapa), Jesús, Almudena y Rocio. Así como a la gente del pasillo, Rosalía, Manoli, Bea...etc. Gracias también a todas aquellas personas y grupos por las colaboraciones realizadas, por compartir sus secretillos de los protocolos y por las moscas prestadas: B-17, B-19, Jesús Romero, Fernando Moya, Macu, Antonio Baonza....., ha sido un placer.

Una mención especial se merece ese servicio de microscopía tan bueno que tiene la UAM, con sus integrantes fantásticos, Covadonga y Paco. Muchas gracias chicos, por todos los cortes realizados y la ayuda prestada, no se que hubiera sido de mí sin vosotros. Y también a las chicas del Confocal, Lola y Lucía, muchas gracias por vuestra profesionalidad y simpatía, da gusto trabajar con vosotras. Sin vosotros no habría tesis.

A mis compañeros de laboratorio en Alemania, Sven, Annie, Claudia, Frank, Max, Antje, Naomi, Verónica, Thomas, Christian, Anja,...etc, por facilitarme las cosas y ayudarme a desenvolverme en un medio extraño, y especialmente a Antje, Claudia y Naomi por la amistad que entablamos y por lo divertidas que sois.

Bueno, a mis amiguitas del comando Begoña (Tere, Marta y Roci, ya sabéis que el orden de factores no altera el buen producto) y los “comandos anexados”.... Arancha, Sara R. Sara L., que deciros que no sepáis ya., que muchas gracias por todo,,,, que siempre

puedo contar con vosotras, que os quiero mucho, y que ahora que he terminado os prometo que me veréis más el pelo, ok? Ah y que no cambies nunca, sois geniales. Igualmente les doy las gracias a todos mis amigos/as del instituto, de Biológicas, de Valencia, de Turkia.....de viajes..... que no puedo nombrarlos aquí a todos, por todos los buenos momentos que me habéis hecho pasar.

A mi equipo de baloncesto “Las de siempre” también quiero agradeceros vuestro cariño y preocupación, sois un encanto,,,,,,,,,me alegro mucho de haberos conocido y a ver si ganamos algún partidito este año „eh??, mil besos a todas.

A mi amor, Aguado, quiero darle las gracias por todos estos años vividos en su compañía, porque nos hemos hecho mayores juntos y por todo lo que me quiere: yo también te quiero mucho. Y por lo mucho que nos queda por vivir. Y a mi familia política, porque sois muy majos y siempre me habéis tratado como una más,,,,,,,,, gracias a todos/as... cuñaaaaaassssss.

A mi familia: padres, hermanos/a, cuñadas/o y sobrinitos quiero darles las gracias por todo: por el amor recibido, por cómo me mimáis y porque sois geniales tal como sois. Sois el motor que me guía. A mi sobrino David decirle que tiene un corazón muy grande y mi sobrina Martita que es maravillosa y que os quiero mucho a los dos. A mi hermano Carlos: me encanta que te animaras a viajar a Alemania,,,,,,,,, A mi hermano Arturo y Maica que sois encantadores, que me encanta que me miméis (seguid así) y a mi futuro sobrinito, Arturito, que le quiero mucho ya sin conocerle.....que nazca ya! A mi sister Rocio, que además de hermana es mi mejor amiga, quería agradecerle especialmente su preocupación por mí y todo el amor que me dedica, ya sabes que yo también te quiero mucho y estoy muy orgullosa de ti. A mi padre me gustaría agradecerle su esfuerzo y dedicación para crear una familia, también decirle cuánto desearía que estuvieras aquí, que no te olvido y que espero que estés orgulloso de mí. Te quiero mucho. Mama, a ti quiero agradecerte otra vez (porque con una vez no es suficiente) el ejemplo de coraje y valentía que nos has dado a toda la familia, y el esfuerzo y sacrificio que has hecho para proporcionarnos una educación. Lo has hecho mejor imposible, yo te pongo un sobresaliente *cum laude*. Gracias por todo tu amor, y porque siempre siempre siempre estás ahí. Eres el ejemplo de madre a seguir, te quiero mucho.

A todos los más cercanos, que habéis tenido que soportar mis cambios de humor, mis subidas y bajadas en este último periodo “tesiniano” (yo antes era muy maja je je) os pido perdón, lo siento de veras.

RESUMEN/SUMMARY

Resumen

El mutante *Chc*⁴ de *Drosophila* es el único alelo en la cadena pesada de la clatrina identificado hasta la fecha en metazoos que no es completamente letal. En esta tesis identificamos el cambio de un residuo en la región de la “rodilla” de la molécula como responsable de la reducción hipomórfica y semi-dominante de la función endocítica de estos mutantes. Centrándonos en la retina de *Drosophila*, encontramos que el defecto en endocitosis causa la muerte de los dos principales tipos celulares, las células pigmentarias y las neuronas fotorreceptoras. La muerte de las células pigmentarias interommatidiales se suprime mediante la reducción de la función de Notch, y en animales control puede reproducirse incrementando los niveles de Notch en dichas células pigmentarias. Estos resultados sugieren fuertemente que la muerte celular de las células pigmentarias se debe a un incremento de la señalización mediada por Notch, como consecuencia de los defectos en endocitosis del mutante, indicando la importancia de la endocitosis mediada por clatrina en la regulación del receptor Notch. La neurodegeneración retiniana producida por la mutación en clatrina es dependiente de iluminación y tiene lugar mediante apoptosis y activación de caspasas.

Summary

Drosophila Chc4 constitutes the only non-lethal mutant allele of clathrin heavy chain identified to date in any metazoan. In this thesis, we identify a change of residue in the knee region of the molecule, as responsible for the semi-dominant hypomorphic reduction in the endocytic function of this mutant. Focusing on *Drosophila* retina, we find that the endocytosis defect is responsible for the death of the two main cell types, pigment cells and photoreceptor neurons. The interommatidial pigment cells death can be suppressed by reduction of Notch function, and can be reproduced in wild type animals by an increase of Notch levels in those pigment cells. Our results strongly support that retinal pigment cell death is due to increased Notch signaling resulting from the endocytosis defect in the mutant, and provide a dramatic example of the importance of Notch downregulation by endocytosis. The retinal neurodegeneration induced by the clathrin mutation is light-dependent and takes place through caspase activation and apoptosis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
1. LAS ALTERACIONES EN LA ENDOCITOSIS Y SU REPERCUSIÓN EN EL MANTENIMIENTO DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	6
2. LA ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE CLATRINA.	7
3. LA CLATRINA.	9
4. LA CLATRINA DE <i>D. MELANOGASTER</i>.	11
5. LA RETINA DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> COMO MODELO DE MUERTE CELULAR. 12	
5.1. <i>D. MELANOGASTER</i> COMO SISTEMA MODELO.	12
5.2. EL OJO COMPUESTO DE <i>DROSOPHILA</i> Y SU DESARROLLO.	14
5.3. MORFOLOGÍA DE UN OMATIDIO ADULTO DE <i>DROSOPHILA</i>	18
6. EL RECEPTOR NOTCH.	21
6.1. ENDOCITOSIS Y SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR NOTCH.	22
OBJETIVOS.....	26
MATERIALES.....	28
1. <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>.	28
1.1. CONDICIONES ESTÁNDAR DE CULTIVO DE <i>DROSOPHILA</i>	28
1.2. MODIFICACIONES DE LA ILUMINACIÓN.	28
1.3. MODIFICACIONES DE LA TEMPERATURA.	28
1.4. LÍNEAS DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> EMPLEADAS.	29
2. CEPAS BACTERIANAS.	31
3. PLÁSMIDOS.	32
3.1. VECTORES BACTERIANOS.....	32
3.2. VECTORES DE EXPRESIÓN EN <i>D. MELANOGASTER</i>	32
3.3. CONSTRUCCIONES.	32
4. OLIGONUCLEÓTIDOS.	32
5. ANTICUERPOS Y FLUORÓFOROS.....	33
5.1. ANTICUERPOS PRIMARIOS.	33
5.2. ANTICUERPOS SECUNDARIOS.....	33
5.3. FLUORÓFOROS.	34
6. MEDIOS PARA CULTIVOS CELULARES.	34
6.1. MEDIO M3 COMPLETO.	34
MÉTODOS.....	34
1. BIOLOGÍA MOLECULAR.	34

1.1. PURIFICACIÓN DEL ADN.....	34
1.1.1. Purificación de ADN plasmídico y de productos de PCR.....	34
1.1.2. Purificación del ADN genómico de una mosca.	35
1.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	35
1.2.1. Reacción asimétrica en cadena de la polimerasa para la obtención de ADN de cadena sencilla...35	
1.3. SECUENCIACIÓN DEL ADN.....	36
1.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS.....	36
1.5. GENERACIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN pUAST-CHC ^{WT} Y pUAST-CHC ^{A1082T}	36
1.6. GENERACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS.....	38
1.7. EL SISTEMA UAS/ GAL4.....	39
2. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL OJO ADULTO DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>.....	39
2.1. MICROSCOPIA ÓPTICA. SECCIONES SEMIFINAS DE OJO ADULTO DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	39
2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN. SECCIONES ULTRAFINAS DE OJO ADULTO DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	40
2.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE OJO ADULTO DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	40
3. ANÁLISIS DE LA RETINA PUPAL DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>.....	41
3.1. DETERMINACIÓN DE LA MADUREZ DE LA RETINA PUPAL.....	41
3.2. INMUNOFUORESCENCIA.....	42
3.3. DETECCIÓN DE MUERTE CELULAR MEDIANTE TINCIÓN CON NARANJA DE ACRIDINA.....	43
3.4. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS PIGMENTARIAS INTEROMATIDIALES SOBRANTES POR OMATIDIO.....	43
4. ENSAYO CELULAR DE ENDOCITOSIS.....	43
5. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL DISCO DE OJO MEDIANTE TINCIÓN CON SULFITO DE COBALTO.44	
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	45
7. INFORMÁTICA.....	45
RESULTADOS.....	46
1. DETERMINACIÓN DE LA LESIÓN MOLECULAR RESPONSABLE DE LA MUTACIÓN CHC^d. 47	
1.1. CHC ^d PRESENTA UN CAMBIO ESPECÍFICO DE LA ALANINA 1082 A TREONINA.....	47
1.2. EL CAMBIO ALANINA 1082 A TREONINA ES RESPONSABLE DE LA MUTACIÓN EN CHC ^d	51
2. ALTERACIONES FUNCIONALES CELULARES DE LA ENDOCITOSIS EN EL MUTANTE CHC^d. 56	
2.1. LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA CLATRINA MUTANTE NO ESTÁ ALTERADA.....	56
2.2. CHC ^d CAUSA UNA DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD ENDOCÍTICA EN LAS CÉLULAS DE GARLAND.....	57
3. FENOTIPOS DETECTADOS EN LA RETINA DEL MUTANTE CHC^d.....	60
3.1. CHC ^d INDUCE NEURODEGENERACIÓN RETINIANA DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD MEDIANTE APOPTOSIS....	60
3.2. CHC ^d INDUCE LA MUERTE DE LAS CÉLULAS PIGMENTARIAS INTEROMATIDIALES.....	64
3.2.1. La mutación A1082T de clatrina es necesaria y suficiente para inducir la muerte de las células pigmentarias.....	67

3.2.2. La supresión de apoptosis no rescata la muerte de las células pigmentarias en el mutante en <i>clatrina</i> .	71
4. EL DESARROLLO LARVARIO DE LA RETINA NO SE VE AFECTADO EN EL MUTANTE <i>CHC^d</i>.	75
5. <i>CHC^d</i> INHIBE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DE LOS PRECURSORES DE LAS CÉLULAS PIGMENTARIAS INTEROMATIDIALES.	76
5.1. LA INHIBICIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DE PRECURSORES DE CÉLULAS PIGMENTARIAS PROVOCA CAMBIOS EN LA SUPERFICIE OCULAR.	80
6. EL FENOTIPO RETINIANO DE <i>CHC^d</i> ESTÁ DETERMINADO POR LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR NOTCH.	82
6.1. INTERACCIÓN GÉNICA ENTRE MUTANTES DE <i>NOTCH</i> Y <i>CHC^d</i> .	83
6.2. CAMBIOS EN LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL RECEPTOR NOTCH EN LAS CÉLULAS PIGMENTARIAS DEL MUTANTE <i>CHC^d</i> .	85
6.3. ALTERACIONES EN NOTCH SON SUFICIENTES PARA PROVOCAR LA MUERTE DE LAS CÉLULAS PIGMENTARIAS DE LA RETINA.	87
7. LA INTERACCIÓN ENTRE <i>CHC^d</i> Y <i>NOTCH</i> SE MANTIENE EN OTROS TEJIDOS.	90
DISCUSIÓN.	94
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CELULAR DE LA MUTACIÓN <i>CHC^d</i> .	95
CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO RETINIANO DE <i>CHC^d</i> .	97
EFFECTOS DE LA MUTACIÓN <i>CHC^d</i> SOBRE EL DESARROLLO DE LA RETINA.	99
IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR NOTCH EN EL FENOTIPO DE MUERTE DE IOPCs.	101
CONCLUSIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	107

Abreviaturas

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario al ARN mensajero
APF	Después de la formación del pupario (After Puparium Formation)
BSA	Albúmina de suero bovino
BDGP	Berkeley <i>Drosophila</i> Genoma Project
CCs	Células del cono
CHC	Cadena pesada de la clatrina (Clathrin Heavy Chain)
CLC	Cadena ligera de la clatrina (Clathrin Ligth Chain)
EMS	Etilmetano-sulfonato
IF	Inmunofluorescencia
IOPCs	Células pigmentarias interomatidiales (Interomatidial Pigment Cells)
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
MF	Surco morfogénico (Morphogenetic Furrow)
M3	Medio de cultivo Shields and Sang para crecimiento de células de <i>D. melanogaster</i>
NECD	Dominio extracelular del receptor Notch
NICD	Dominio intracelular del receptor Notch
pb	Pares de bases
PBS	Solución tamponada con fosfatos (Phosphate-Buffered Saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PPCs	Células pigmentarias primarias (Primary Pigment Cells)
R1-R8	Neuronas fotorreceptoras

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. Las alteraciones en la endocitosis y su repercusión en el mantenimiento de la viabilidad celular.

Con el aumento de la esperanza de vida en las sociedades desarrolladas y la mejora en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas está experimentando un fuerte aumento, y con ellas el interés social y biomédico que despiertan.

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo con causas y factores de riesgo generalmente poco conocidos, diagnóstico problemático, tratamiento prácticamente inexistente y pronóstico invariablemente fatal. Se caracterizan por presentarse con mucha mayor frecuencia en la tercera edad y por manifestarse preferentemente en el sistema nervioso, a pesar de que en muchos casos el defecto es común a todas las células del organismo.

La endocitosis constituye un mecanismo básico de la función sináptica, y por ello hemos establecido como hipótesis central de nuestras investigaciones el intentar demostrar que alteraciones en la endocitosis, pueden generar trastornos causantes de degeneración neuronal. Algunos estudios apuntan a una implicación de la endocitosis a nivel de los terminales sinápticos en neurodegeneración. Así, se ha descrito que alteraciones en la endocitosis alteran el procesamiento normal del precursor de la proteína amiloide (Refolo et al., 1995), que otra proteína implicada en formas tempranas de Alzheimer familiar, la presenilina 1, es procesada en vesículas endocíticas (Efthimiopoulos et al., 1998) e incluso que las cascadas bioquímicas responsables de la apoptosis neuronal pueden iniciarse a nivel sináptico (Mattson et al., 1999).

En nuestro grupo hemos abordado por lo tanto, el estudio de una mutación en el gen de la *cadena pesada de la clatrina (Chc)* para comprobar si induce específicamente un mayor daño en el tejido nervioso, provocando neurodegeneración. Al tratarse de un gen esencial para la endocitosis, un mecanismo celular básico, su falta de función causa letalidad embrionaria. Sin embargo, el alelo *Chc⁴* de *Drosophila melanogaster* constituye una oportunidad excepcional, al ser el único alelo mutante en clatrina de metazoos que no es absolutamente letal, presentando una supervivencia en torno al 20%, lo que permite el estudio de los adultos supervivientes.

En el estudio de la neurodegeneración en *Drosophila*, un modelo extraordinariamente útil lo constituye la retina, donde se ha estudiado la manifestación de la muerte neuronal en múltiples ocasiones (Feany and Bender, 2000, Fernandez-Funez et al., 2000, Jackson et al., 2002, Marsh et al.,

2003). Ello se debe a las particulares características del ojo compuesto de *Drosophila*, que presenta un altísimo grado de organización que hace perceptibles pequeños defectos en el número y disposición de sus células.

2. La endocitosis dependiente de clatrina.

La endocitosis es el proceso celular básico por el que se trasladan moléculas o partículas entre la membrana y los compartimentos membranosos, mediante vesículas. Tradicionalmente el proceso comienza con la invaginación de la membrana plasmática en la zona de las moléculas o partículas a endocitar, que se escinden en el interior de la célula (internalización), formando la vesícula. Las moléculas internalizadas, viajan posteriormente a los endosomas denominados primarios, desde donde serán dirigidas hacia múltiples localizaciones, pudiendo ser recicladas a la membrana plasmática o transportadas a los lisosomas para ser degradadas.

La endocitosis tiene lugar por diferentes mecanismos que se dividen en dos categorías en base al material internalizado: fagocitosis, cuando la captura es de partículas grandes (>200 nm), y pinocitosis, cuando se internaliza el medio extracelular y solutos de menor tamaño. La pinocitosis se subdivide en función de las proteínas que participan en: macropinocitosis, endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolina y endocitosis independiente de clatrina y de caveolina (Conner and Schmid, 2003). La endocitosis dependiente de clatrina implica la formación de vesículas con una cubierta de clatrina, un proceso que tiene lugar en todas las células eucariotas.

La clatrina se expresa ubicuamente en protozoos y en todas las células de metazoos. En protozoos, la endocitosis mediada por clatrina es prescindible para su viabilidad, mientras que en metazoos es esencial a nivel celular. En metazoos, la endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina participa en múltiples procesos: en la internalización continua de nutrientes esenciales, en la comunicación intercelular durante el desarrollo y durante la vida de los organismos, mediante la modulación de los niveles de los receptores en la membrana (González-Gaitán and Stenmark, 2003), o su rápida atenuación una vez activados (Di Fiore and De Camilli, 2001, Seto et al., 2002), en la formación de los gradientes de morfógenos durante el desarrollo de los individuos (González-Gaitán, 2003), y en el reciclaje de vesículas sinápticas (González-Gaitán and Jackle, 1997, Slepnev and De Camilli, 2000).

La endocitosis dependiente de clatrina se inicia normalmente en sitios especializados de la membrana plasmática, donde se forma una estructura compleja, constituida por el ensamblaje de diferentes proteínas, con el objetivo de concentrar las moléculas en la superficie para su posterior

internalización. Seguidamente, se forma una invaginación de la membrana plasmática, formándose así la vesícula recubierta de clatrina. Las fases que integran la endocitosis mediada por clatrina son: formación de la invaginación, maduración, excisión de la vesícula y por último desensamblaje de la cubierta (Fig. I.1) (Takei and Haucke, 2001, Slepnev et al., 2000).

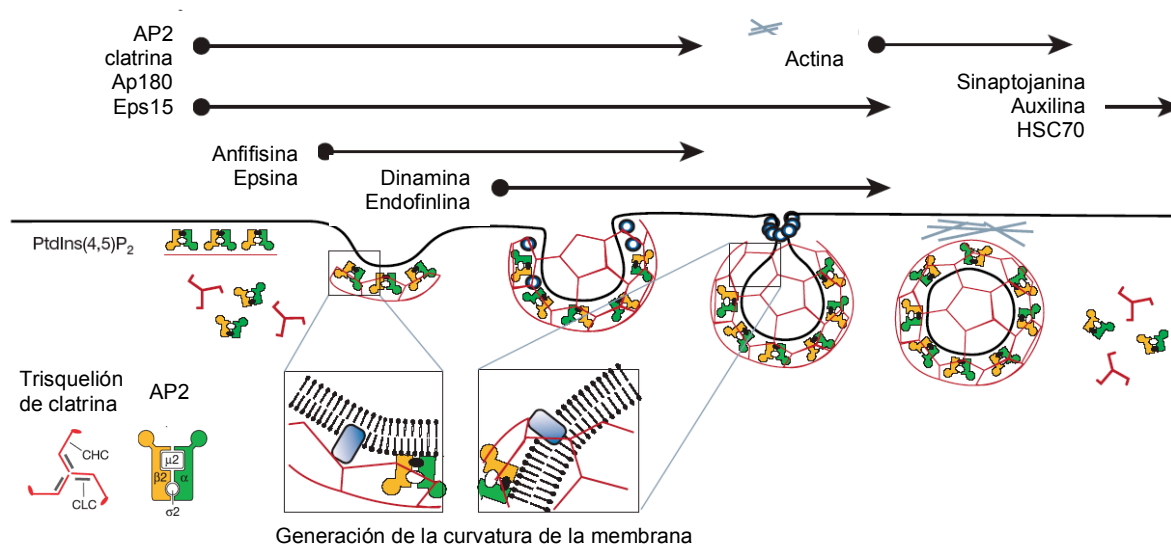


Figura I.1. La endocitosis mediada por clatrina está acompañada por las interacciones con múltiples factores regulados espacial y temporalmente. Las flechas ilustran de un modo aproximado las relaciones temporales entre las interacciones dinámicas que dirigen la endocitosis mediada por clatrina. Imagen adaptada de Conner y col, 2003 (Conner and Schmid, 2003).

Desde que se descubrieron las vesículas recubiertas de clatrina, se han caracterizado múltiples componentes que participan en las diferentes fases del proceso (Fig. I.1). Entre ellas destacan las proteínas adaptadoras (AP). Estas proteínas se encuentran formando heterotetrámeros que unen la clatrina a la membrana plasmática, y están implicadas en el reconocimiento de diferentes dominios de las regiones citoplasmáticas de los receptores de membrana (pej. LDL y EGFR) (Kirchhausen, 2000b). AP-2, es la principal proteína adaptadora, participando en el reclutamiento de clatrina, así como en la interacción con otras proteínas reguladoras de la endocitosis (epsina, AP180/CALM, β-arrestinas, anfibisina, sinaptojanina y proteínas endocíticas que contienen los motivos DPF, Asp-Pro-Phe ó DPW, Asp-Pro-Trp) (Mousavi et al., 2004).

Las vesículas recubiertas de clatrina, además participan en el transporte a lo largo de la ruta de secreción, concretamente en el tráfico desde el trans-Golgi hacia la membrana plasmática, ó hacia los lisosomas, donde el principal adaptador es la proteína AP-1 (Kirchhausen, 2000a). Por tanto las

vesículas recubiertas de clatrina, participan en el tráfico de vesículas, tanto de la vía endocítica como de la vía secretora (Mousavi et al., 2004).

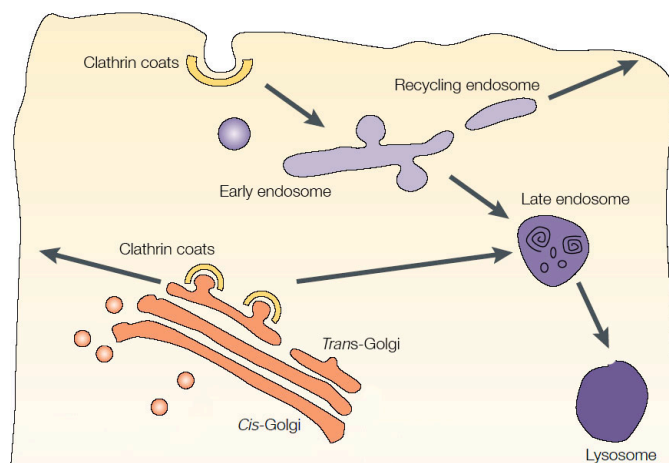


Figura I.2. Participación de la clatrina en el tráfico vesicular. La clatrina participa en la vía endocítica de las macromoléculas que son internalizadas en la membrana plasmática hacia los endosomas primarios y también en el transporte de las moléculas sintetizadas desde el trans-Golgi bien, hacia la membrana plasmática, bien hacia los lisosomas. Imagen adaptada de Kirchhausen, 2000 (Kirchhausen, 2000b).

3. La clatrina.

La molécula de la clatrina se descubrió a partir del aislamiento de vesículas recubiertas en los oocitos del mosquito *Aedes aegypti* (Roth and Porter, 1964). La unidad funcional de la clatrina denominada trisquelión, está constituida por tres moléculas de cadena pesada de clatrina (CHC, 190 kDa), unidas por su extremos carboxilo terminales y tres cadenas ligeras de clatrina (CLC, 35-40 kDa) (Fig. I.3A). La caracterización bioquímica de la clatrina (Pearse, 1987) y los análisis moleculares tanto de la cadena pesada como de la ligera se han realizado principalmente en mamíferos (Kirchhausen, 2000a, Mousavi et al., 2004) y levaduras (Payne and Schekman, 1985, Lemmon et al., 1991).

El polipéptido CHC presenta 5 regiones funcionalmente diferentes: el dominio globular amino-terminal, la “rodilla” que divide el polipéptido en la “pata proximal” y la “pata distal” y el extremo carboxilo terminal responsable de la trimerización de la molécula (Fig. I.3A; Schmid, 1997, Greene et al., 2000). El dominio N-terminal, que está asociado a la región distal de la molécula por un segmento flexible o “conector”, posee una estructura de lámina beta (ter Haar et al., 1998) y contiene los sitios de unión que median las interacciones con las diferentes proteínas adaptadoras, (AP-2, β -arrestina, AP180/CALM, etc; ter Haar et al., 2000, Kirchhausen, 2000a). El dominio proximal, posee una estructura secundaria de hélices- α , de corta longitud dispuestas en zig-zag perpendicularmente al eje de la pata, al igual que en la región “conectora” de la molécula. Se ha

postulado, que el resto de los dominios de la pata de la molécula (rodilla y pata distal) pudieran tener una estructura similar de hélices- α (Fig. I.3B). Cada molécula de CHC interacciona con una molécula de CLC, mediante la “pata proximal” (Fig. I.3A; Ybe et al., 1998).

Los trisqueliones a su vez, se ensamblan entre sí, formando una red poligonal, y forman las estructuras cerradas ó cubiertas de clatrina, constituidas por distintas combinaciones de caras hexagonales y pentagonales (Fig. I.3B). Los contactos intermoleculares necesarios para la formación de cubiertas de clatrina, se dan entre las regiones proximales y distales de CHC (Ybe et al., 1999).

La región de la “rodilla”, es el único dominio de CHC al que no se le ha asignado interacciones con ninguna proteína (Ybe et al., 1999).

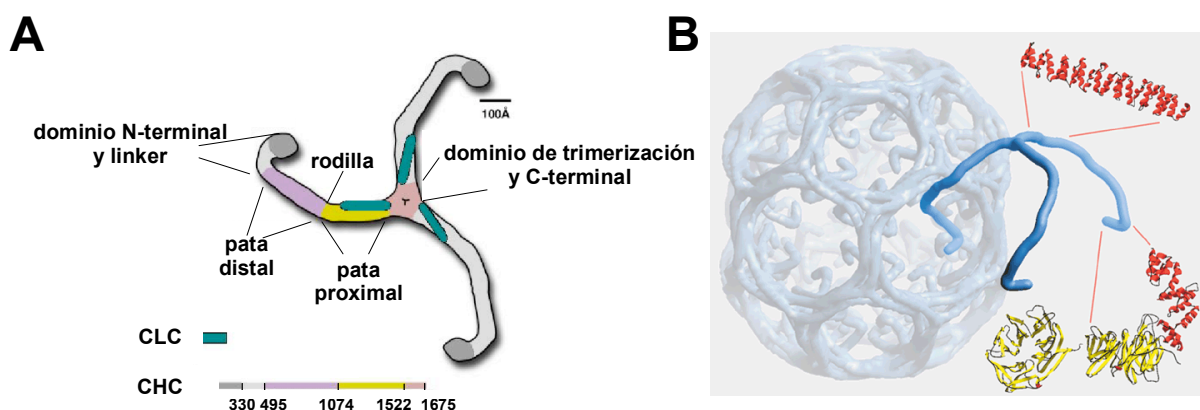


Figura I.3. A. Regiones funcionales del trisquelión de clatrina. El trisquelión está formado por tres cadenas pesadas de clatrina (CHC, 1675 aa en mamíferos) y tres cadenas ligeras de clatrina (CLC). El dominio de trimerización entre las cadenas de CHC se encuentra en la región C-terminal. Las moléculas de CLC interaccionan con el dominio proximal de cada molécula de CHC. **B. Cubierta de clatrina.** Los trisqueliones se unen entre sí para formar las cubiertas de clatrina, mediante interacciones entre los dominios proximales y distales de las cadenas pesadas de clatrina. Los dominios globulares N-terminal de CHC, tienen una estructura de lámina- β y se disponen hacia el interior de la cubierta. La región proximal y “conectora” poseen una estructura 2^ª de hélices- α . Imagen adaptada de Kirchhausen, 2000 (Kirchhausen, 2000a).

La proteína CHC está altamente conservada a lo largo de la evolución, ya que organismos tan diferentes como levaduras y humanos presentan en torno a un 50 % de identidad de secuencia de aminoácidos entre sus cadenas pesadas de clatrina. La cadena pesada de clatrina de *Drosophila*, presenta una identidad en su secuencia de aminoácidos del 80% y del 77% con respecto a las clatrinas CHC-17 y CHC-22 de humanos, que a su vez tienen un 85% de indentidad entre sí (Tabla I.1; Kedra et al., 1996).

La clatrina es un gen esencial en organismos multicelulares, aunque los organismos unicelulares como la levadura *Sacaromyces cerevisiae* (Payne and Schekman, 1985, Lemmon and

Jones, 1987) y el protozoo *Dyctiostelium discoideum* (O'Halloran and Anderson, 1992) sobreviven y crecen lentamente en ausencia de la cadena pesada de la clatrina, en condiciones de laboratorio. Sin embargo, los procesos de diferenciación tras someterlos a restricción alimenticia, como la esporulación en *Saccharomyces* y la agregación en *Dyctiostelium*, se ven interrumpidos indicando que estos procesos requieren la función de la clatrina.

	<i>D. melanogaster</i>		<i>C. elegans</i>		<i>D. discoideum</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
% identidad proteína	80	77	71	69	58	56	50	49
<i>H. sapiens</i>	CHC17	CHC22	CHC17	CHC22	CHC17	CHC22	CHC17	CHC22

Tabla I.1. Porcentajes de identidad entre los aminoácidos de la cadena pesada de la clatrina en diferentes especies y las isoformas humanas (CHC17 y CHC22). Tomada de Kedra y col, 1996.

4. La clatrina de *D. melanogaster*.

La cadena pesada de la clatrina en *D. melanogaster* fue identificada por el grupo de Sandra Lemmon (Bazinet et al., 1993). La cadena pesada de la clatrina está codificada en *D. melanogaster* en un único locus, en la región 13F5-7 del cromosoma *X* y no se conocen formas de splicing alternativo. La unidad transcripcional de *Chc* está compuesta por 7 exones, de los cuales el exón número 1 no es codificante. El ADNc de *Chc* posee un tamaño de 5034 nucleótidos y codifica para un polipéptido de 1678 aa (1675 en mamíferos).

Dicho grupo aisló, además, una serie de mutantes en el gen *Chc*, inducidos con el agente Etilmetano-sulfonato (EMS; Bazinet et al., 1993). Los alelos identificados: *Chc*¹, *Chc*², *Chc*³ son letales embrionarios en homocigosis y hemicigosis (con una copia mutante en machos, dado que se encuentra en el cromosoma *X*), demostrando que la función de la clatrina en organismos multicelulares es esencial para la supervivencia.

En el mismo estudio, se aisló el mutante *Chc*⁴ que es parcialmente viable, obteniéndose un reducido número de individuos homocigotos y hemicigotos para la mutación que llegan a alcanzar el estadio adulto. El alelo *Chc*⁴ fue descrito por el mismo grupo como sensible a temperatura, debido a que el número de supervivientes adultos homocigóticos y hemicigóticos *Chc*⁴ que se obtenían a 25° C era inferior que a 18° C. Los adultos *Chc*⁴ presentan, también, una viabilidad reducida y en el caso de los machos un fenotipo de esterilidad, sugiriendo un papel importante de la endocitosis mediada por clatrina en la espermatogénesis (Bazinet et al., 1993). Posteriores estudios han demostrado

alteraciones en el proceso de individualización del espermatozoides en los machos hemicigóticos *Chc*⁴ (Fabrizio et al., 1998).

Así mismo se observó que las frecuencias de complementación (con el gen *Chc*), que presentaba el mutante *Chc*⁴ eran inferiores a las esperadas y a las mostradas por los otros alelos *Chc*¹, *Chc*², *Chc*³. Por tanto, se ha sugerido un posible efecto dominante negativo de la mutación *Chc*⁴ (Bazinet et al., 1993).

5. La retina de *Drosophila melanogaster* como modelo de muerte celular.

5.1. *D. melanogaster* como sistema modelo.

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo con un ciclo vital dividido en dos fases diferentes: larva y adulto (Fig. I.4). Tras el desarrollo embrionario que dura 24 horas a 25° C, del huevo emerge una larva que en condiciones idóneas pasará por tres estadios de desarrollo larvarios durante cinco días, produciéndose entre ellos dos mudas de la cutícula. Cuando la larva ha acumulado suficientes reservas, la hormona ecdisona dispara el inicio de la metamorfosis de la larva, con la secreción del pupario o cápsula. Dentro del pupario, *Drosophila* sufre la histólisis de la gran mayoría de los tejidos larvarios y, a partir de los discos imaginales y de grupos celulares específicos, se generan las estructuras que configuran el individuo adulto. La mosca emerge del pupario aproximadamente al décimo día del desarrollo a 25° C, siendo capaz de volar y aparearse a las pocas horas, y de poner los primeros huevos al día. En condiciones ideales, las moscas viven hasta dos meses, aunque su esperanza de vida media es en torno a un mes y medio.

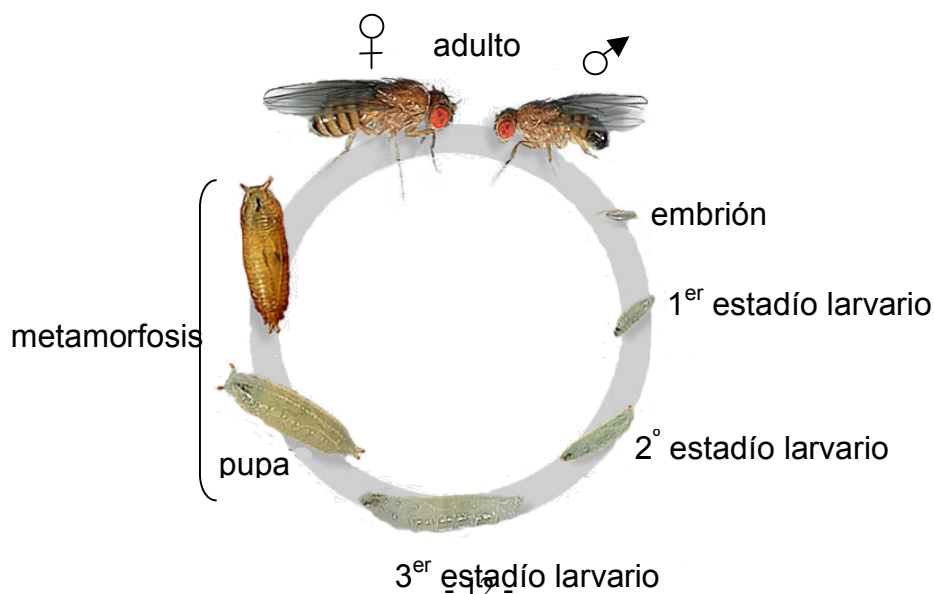


Figura I.4. El ciclo vital de *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster constituye un sistema modelo muy potente de investigación biomédica debido a la facilidad de poder combinar aproximaciones genéticas, moleculares, bioquímicas y celulares, y porque tras la secuenciación de su genoma, se ha puesto en evidencia la multitud de genes que comparten con humanos, y la gran cantidad de procesos de señalización implicados en patologías que están conservados entre la mosca y humanos (Kornberg and Krasnow, 2000, Fortini and Bonini, 2000, Chien et al., 2002, Driscoll and Gerstbrein, 2003).

Con el desarrollo hace diez años de la expresión híbrida en transgénesis, usando el sistema UAS-GAL4 de levaduras, se obtuvo una potente herramienta para estudiar *in vivo* la función de los genes (Brand and Perrimon, 1993). En este estudio empleamos dicha técnica para expresar construcciones control y mutantes en diferentes tejidos y estadios de la mosca. El funcionamiento de esta técnica se representa en el esquema de la figura I.5.

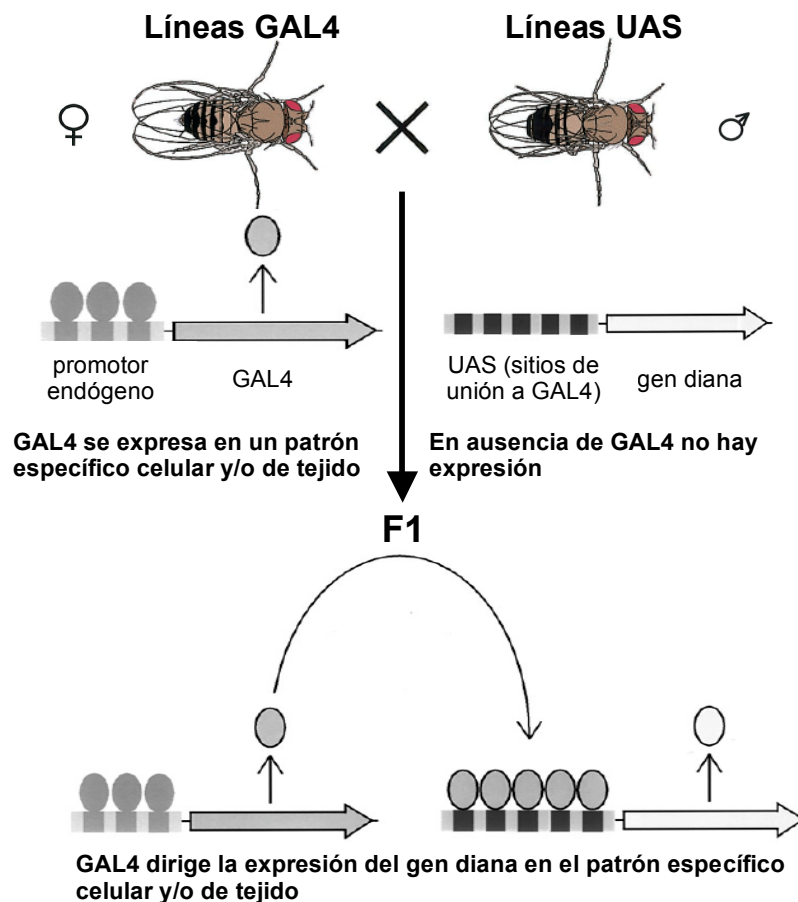


Figura I.5. Representación esquemática del funcionamiento del sistema UAS-GAL4. Por una parte, este sistema consta de líneas transgénicas denominadas activadoras ó GAL4, que expresan el factor de transcripción GAL4 bajo el control de promotores específicos. Por otra parte, consta de líneas transgénicas denominadas efectoras ó UAS que contienen el gen de interés bajo el control de elementos UAS, a los que se une el activador GAL4. Sólo en la descendencia del cruce de las líneas UAS con las líneas GAL4 se producirá la expresión del transgén en aquellas células donde se produzca la expresión de la construcción activadora GAL4. Imagen adaptada de Phelps y Brand, 1998 (Phelps and Brand, 1998).

5.2. El ojo compuesto de *Drosophila* y su desarrollo.

El ojo adulto de *D. melanogaster* está compuesto por unas 800 unidades repetidas, llamadas omatidios, que se organizan en filas y en columnas formando una red hexagonal (Fig. I.6A-B), de modo que cada unidad esta rodeada por 6 omatidios vecinos. De las más de 20 células que integran un omatidio, únicamente 8 son neuronas fotorreceptoras (R1-R8) y el resto son un conjunto de células accesorias o de soporte, no neurales que se disponen ordenadas en un patrón invariable (Fig. I.6B-C).

El ojo compuesto de *Drosophila* es un sistema modelo muy estudiado, que posee unas características especiales que le confiere gran idoneidad para desarrollar estudios morfogénéticos, y de comunicación celular (Freeman, 1997, Brennan and Moses, 2000, Voas and Rebay, 2004).

En primer lugar, y puesto que está formado por un patrón invariable de células, que le confieren una estructura típica (Fig. I.6A-B), es posible analizar defectos a nivel de una única célula, en cada momento del desarrollo. Además, el ojo compuesto de *D. melanogaster* es un tejido particularmente adecuado para estudiar los efectos de la endocitosis en la comunicación célula-célula que suceden durante el desarrollo, debido a que la especificación de cada tipo celular sucede de un modo independiente de linaje (Ready et al., 1976), en el que las células son reclutadas mediante una secuencia temporal estereotipada de señales inductivas, algunas de la cuales requieren endocitosis (Fig. I.6F; Parks et al., 2000, Stewart, 2002).

En segundo lugar, el ojo es dispensable para la viabilidad o fertilidad de la mosca, lo que hace posible el estudio de mutaciones y construcciones que resultan en letalidad cuando afectan a otros tejidos.

Finalmente, se ha descrito que aunque existe un número de genes de función específica para el desarrollo del ojo, la gran mayoría son requeridos para los procesos celulares generales, por tanto los estudios en el ojo, podrían servir para comprender la función de los genes en otros tejidos.

El ojo compuesto de *D. melanogaster* se forma a partir de un epitelio monocapa, el disco imaginal de ojo-antena. Este disco se origina a partir de las 20 células del primordio óptico durante el blastodermo embrionario (García-Bellido and Merriam, 1969), que se dividen activamente durante la mayor parte del desarrollo larvario. Al principio del 2º estadio larvario, la parte anterior

del disco adquiere un destino de antena y la posterior de ojo. Este proceso está determinado por la vías de señalización del receptor Notch, que promueve el destino de ojo y Ras que lo antagoniza (Kumar and Moses, 2001).

La diferenciación celular se inicia durante la mitad del tercer estadio larvario en el extremo posterior del disco de ojo-antena y avanza en sentido anterior, tardando aproximadamente 2 días en atravesar por completo el campo (Fig. I.6D; Wolff and Ready, 1993). Una constricción apical del epitelio del disco, llamada surco morfogenético (MF, del inglés Morphogenetic furrow) marca el

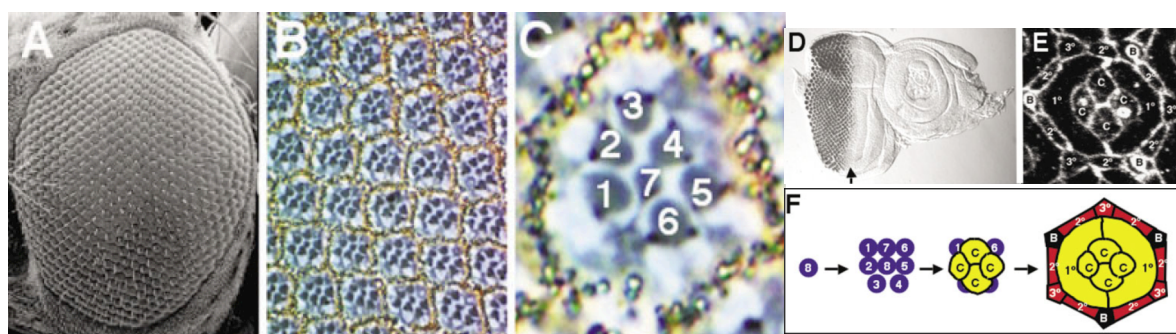


Figura I.6. A. Morfología externa del ojo compuesto de *D. melanogaster*, donde se aprecia el preciso ordenamiento de sus lentes. B. Sección tangencial de un ojo compuesto donde se observa la arquitectura celular subyacente del tejido y su disposición casi cristalina. C. Detalle de B. Los círculos oscuros marcados con los números 1-7, son los órganos fotorreceptores llamados rabdomeros. Los granulos de pigmentos producidos por las células pigmentarias forman una red hexagonal que rodea a los fotorreceptores de cada ommatidio. D. Disco imaginal de ojo-antena en el 3^{er} estadio larvario, marcado con un anticuerpo que reconoce las neuronas. Un frente de morfogénesis responsable de la determinación de la primera neurona, R8, atraviesa el disco desde el extremo posterior (a la izquierda) al anterior, y se denomina surco morfogenético (flecha). E. Zona apical de un ommatidio de un disco imaginal de pupa teñido con el anticuerpo anti-armadillo, que marca los contactos celulares. Célula del cono (C), células pigmentarias primarias (1°), secundarias (2°) y terciarias (3°) y B, quetas mecanosensoriales. F. Secuencia temporal de la especificación de los distintos tipos celulares que integran un ommatidio. Los círculos morados corresponden a las neuronas, las células del cono y las pigmentarias primarias están en amarillo, las células pigmentarias interommatidiales en rojo y las quetas en negro. Tomado de Voas y Rebay, 2004 (Voas and Rebay, 2004).

paso de esta oleada de diferenciación (Fig. I.6D, flecha; Ready et al., 1976). El surco morfogenético, cuya progresión está dirigida por la expresión de *hedgehog* (*hh*), es el lugar donde comienza la activación de diferentes factores de transcripción que determinarán la diferenciación de los fotorreceptores, que son por tanto las primeras células en determinarse, durante el tercer estadio larvario (Fig. I.6F; Voas and Rebay, 2004). La función del receptor Notch es necesaria en el disco imaginal de ojo para la determinación del primer fotorreceptor en especificarse, R8 (Baker and Yu, 1997, Li and Baker, 2001). Cada nueva neurona R8 especificada se convierte en la célula fundadora de un ommatidio, iniciando un proceso de reclutamiento secuencial de las otras células (Fig. I.6F). Después de la determinación de R8 se ha comprobado que la vía mediada por EGFR participa en la

determinación de todos los tipos celulares de la retina (Freeman, 1996). Igualmente, la vía de Notch se emplea reiteradamente durante todo el proceso de formación y ensamblaje de los omatidios que darán lugar a la retina adulta (Cagan and Ready, 1989b). Por tanto, cuando se altera la señal de Notch las células adquieren un destino celular erróneo. Y los efectos que se originan son diferentes en función del momento del desarrollo.

Como consecuencia de la inactivación de la vía de Notch (medida por el alelo sensible a temperatura *N^{ts}*) inmediatamente posterior al MF se produce una superproducción masiva de neuronas fotorreceptoras en el disco del ojo de la larva y un exceso de células del cono en el disco de la pupa (Cagan and Ready, 1989b, Parks et al., 1995). Por este motivo se ha descrito que, frente a la vía de EGFR, el papel de la vía de Notch facilitaría el mantenimiento de un estado indiferenciado en las células de la retina (Voas and Rebay, 2004).

Destino celular	Señalización
R8	Falta de Notch
R2, 5	EGFR
R3,4	EGFR
R1,6	EGFR
R7	EGFR, Sev, Notch
CCs	EGFR, Notch
PPCs	EGFR, Notch
IOPCs	EGFR, Notch

Tabla I.2. Señalización necesaria para la especificación de los tipos celulares de la retina. R1-8, neuronas fotorreceptoras. CCs, células del cono. PPCs, células pigmentarias primarias. IOPCs, células pigmentarias interomatidiales. EGFR, Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico. Sev, receptor Sevenless.

Después de la especificación de los fotorreceptores, las últimas células en determinarse durante el tercer estadio larvario, son las 4 células del cono (CCs o C) (Fig. I.6F en amarillo; Wolff and Ready, 1993). Este proceso también es dependiente de las vías de EGFR y de Notch (Freeman, 1996, Cagan and Ready, 1989b).

La especificación de los restantes tipos celulares sucede durante la metamorfosis, después de la pupariación de la larva. Aproximadamente al 6% del desarrollo pupal se produce la eversión del disco de ojo, donde la superficie apical del epitelio de la retina se expone hacia la parte exterior del animal, y el disco imaginal de ojo se transforma en el ojo pupal (Wolff and Ready, 1993). Las primeras células en determinarse en el desarrollo pupal (entre 12 y 18%) son las células

pigmentarias primarias (PPCs), que son 2 por omatidio (Fig. I.7B, gris claro). En torno al 25% del desarrollo pupal (correspondiente a 25 horas, a 25° C), cada omatidio (integrado por 8 neuronas fotorreceptoras, 4 CCs y 2 PPCs), está rodeado por un exceso de células, aún sin determinar, que sufren un proceso de muerte celular programada ó PCD (del inglés, Programmed Cell Death; Wolff and Ready, 1991) para reducir el número final de células que se diferenciaron como pigmentarias o IOPCs (del inglés, InterOmatidial Pigment Cells, fig. I.7C-D, blanco). La muerte celular programada tiene lugar entre el 20 y 30 % del desarrollo pupal.

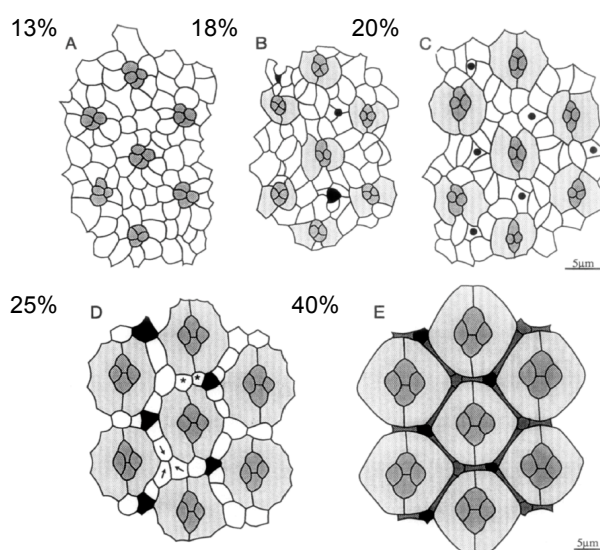


Figura I.7. Desarrollo de la retina en la pupa de *D. melanogaster*. Esquema de la superficie apical del disco imaginal de ojo durante la metamorfosis, donde se indica el reclutamiento temporal de los diferentes tipos celulares que integran la retina en porcentaje del tiempo total de metamorfosis. **A.** Las cuatro células del cono (CCs, gris intermedio) situadas sobre las neuronas ya se han determinado antes de la pupación. **B.** Las primeras células en determinarse en la retina pupal son dos células pigmentarias primarias (PPCs, gris claro) que cambian de morfología y comienzan a rodear a las CCs anterior y posterior de cada omatidio. Se empiezan a detectar las células de las quetas mecanosensoriales (negro). **C.** Entre los omatidios, el entramado de células precursoras de IOPCs comienza a alinearse. Mediante muerte celular programada ó PCD se elimina el exceso de células precursoras de las células pigmentarias interomatidiales (precursoras de IOPCs, en blanco). Este proceso transcurre entre el 20% y el 30% del desarrollo pupal. **D.** Se marcan con flechas y asteriscos las posiciones donde todavía hay exceso de células. **E.** El número de IOPCs en la retina al 40 % del desarrollo pupal ya se ha determinado. En negro, las quetas mecanosensoriales, y en gris oscuro las IOPCs. Imagen tomada de Cagan y Ready 1989 (Cagan and Ready, 1989a).

A diferencia de la determinación de los fotorreceptores de la retina de *Drosophila*, los mecanismos moleculares que determinan la especificación de las IOPCs no han sido aún esclarecidos, aunque al igual que los demás tipos celulares, requiere de la activación del EGFR (Freeman, 1996). Se ha descrito también que la vía de Notch es necesaria para la muerte celular

programada, ya que en mutantes *N* se bloquea la apoptosis de los precursores de las IOPCs (Yu et al., 2002, Miller and Cagan, 1998). En contraposición, la actividad del EGFR previene la muerte celular por apoptosis de dichos precursores (Yu et al., 2002). Los ligandos, Spitz de EGFR, y Delta de Notch, se expresan fundamentalmente en las CCs y PPCs durante este periodo, mientras que EGFR, y Notch, se expresan en las PPCs y sobre todo en los precursores de las IOPCs (Fehon et al., 1990, Parks et al., 1995, Miller and Cagan, 1998). El modelo más aceptado propone que ambas vías actuarían por tanto antagonicamente en el proceso de muerte celular que precede a la especificación de las IOPCs.

Finalmente, al 40 % del desarrollo pupal, las retinas presentan el número correcto de IOPCs. En torno a cada omatidio hay 6 IOPCs compartidas entre dos omatidios contiguos, y 3 IOPCs compartidas con tres omatidios, lo que constituye una media de 4 IOPCs por cada omatidio (Fig. I.7E, gris oscuro).

Las quetas mecanosensoriales del ojo están formadas por 4 células: neurona, tecógena, tricógena y tormógena. Al final del desarrollo pupal, cuando la tricógena y la tormógena han generado la queta y la base que la contiene respectivamente, mueren, quedando únicamente dos células (neurona y tecógena) formando el complejo en el animal adulto. La determinación de las quetas del ojo, tiene lugar de un modo diferente que el resto de la células que integran el omatidio, puesto que las cuatro células proceden de un precursor común (tienen un origen clonal). Las quetas están ausentes cerca de la periferia del ojo, donde su lugar viene ocupado por otra IOPC (Wolff and Ready, 1993).

Después de la especificación de todos los tipos celulares y por tanto del establecimiento del entramado retinal, tiene lugar la maduración de la retina para adecuarse a la función visual. Para ello las células comienzan a elaborar las estructuras especializadas asociadas con su función específica. Los fotorreceptores forman los rabdómeros y secretan el líquido intraomatidial, las CCs y PPCs secretan en primer lugar la quitina que compone la córnea y posteriormente los fluidos del pseudocono, produciendo la lente. Las IOPCs secretan también la quitina que se depositará en los espacios entre las lentes. Tanto las células pigmentarias como las neuronas producen los pigmentos correspondientes, que le dan color al ojo. Y tiene lugar la formación de las quetas (Cagan and Ready, 1989a). El resultado es el ojo adulto.

5.3. Morfología de un omatidio adulto de *Drosophila*.

Las neuronas R1-R8 que integran cada omatidio están situadas en el interior del mismo, rodeadas por las células accesorias o de soporte (Fig. I.8A). R7 y R8 se denominan fotorreceptores internos porque ocupan la posición central en el omatidio. Son más cortos que el resto, situándose

R7 en posición distal, superpuesto sobre R8. R1-R6 son los fotorreceptores externos, que se encuentran rodeando a los fotorreceptores internos. Todos los fotorreceptores proyectan hacia el espacio intraomatidial el órgano fotosensible o rabdómero. Esta estructura consiste en una especialización de la membrana plasmática que contiene la maquinaria necesaria para detectar los fotones de la luz y producir una despolarización de la membrana. Puesto que R7 y R8 se superponen en el mismo eje, en el epitelio de la retina, sólo se observan 7 de los 8 órganos fotorreceptores en una sección típica transversal de un ojo adulto de *Drosophila* (Fig. I.8D-E), organizados siguiendo un patrón trapezoidal. Los fotorreceptores contienen además en la base de los rabdómeros pequeñas cantidades de pigmentos omocromos.

En posición apical sobre los fotorreceptores se disponen las 4 células del cono (CCs, Fig I.8A y C, azul y amarillo pálido), y rodeándolas se encuentran 2 células pigmentarias primarias (PPCs, Fig I.8A y C, naranja). Las 4 CCs, que son imágenes especulares 2 a 2, rodean a las neuronas fotorreceptoras en toda la longitud del omatidio, mientras que las PPCs quedan limitadas a la región apical (Fig. I.8A). Ambos tipos celulares poseen pigmentos omocromos y son las responsables de la secreción del pseudocono y de la córnea.

Rodeando a los fotorreceptores, en los espacios entre omatidios contiguos se encuentran las células pigmentarias interomatidiales o IOPCs. En la literatura, éstas células se clasifican según la posición que ocupan en secundarias (Fig. I.8B-F, morado) y terciarias (Fig. I.8, rojo). Sin embargo, nosotros preferimos no distinguir entre ellas, y denominarlas a todas IOPCs, dado que aparte de su morfología, debido a la posición que ocupan, no se ha visto ninguna diferencia entre ambas. Las IOPCs contienen pigmentos de tipo pteridina y omocromos, y acompañan en toda su longitud a la neuronas fotorreceptoras aislando de este modo a los fotorreceptores que integran cada omatidio.

Las quetas mecanosensoriales se disponen en vértices alternos, en contacto con tres omatidios contiguos (Fig. I.8, amarillo).

En nuestro estudio del mutante *Chc*⁴, hemos comprobado la implicación del receptor Notch en la manifestación del fenotipo de la retina. Por ello vemos conveniente introducir la estructura y funcionamiento de este receptor, que está implicado en numerosísimos procesos en el desarrollo y la biología de los animales.

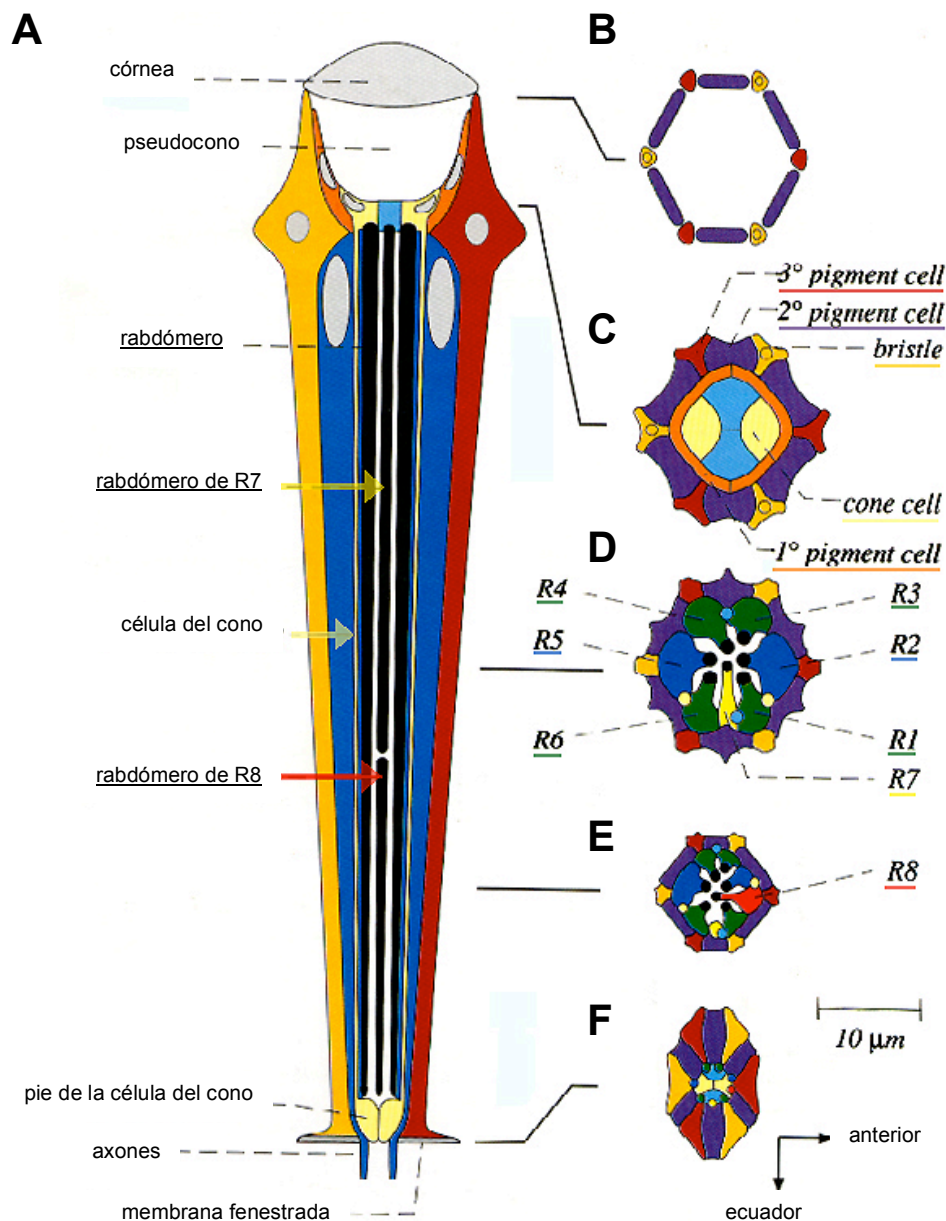


Figura I.8. Esquema de un omatidio adulto de *Drosophila*. A. Sección longitudinal. B-F. Secciones transversales, realizadas a las alturas indicadas del omatidio, donde B es la más apical y F la más basal. Los rabdomeros de los fotorreceptores (R1-R8) se muestran en negro. Las células pigmentarias interommatidiales se representan en morado (2^{aria}) y en rojo (3^{aria}). Las células pigmentarias primarias se muestran en naranja y las cuatro células del cono en azul y amarillo pálido. Los mecanorreceptores o bristles se representan en amarillo. Se observa que la parte basal de los omatidios es más pequeña que la apical. Imagen adaptada de Wolff y Ready, 1993 (Wolff and Ready, 1993).

6. El receptor Notch.

Notch es una proteína transmembrana de tipo I que actúa como receptor en un gran número de procesos celulares como la especificación de destino, diferenciación, proliferación y supervivencia en todos los estadios del desarrollo (Lai, 2004). Se sintetiza como un precursor de 300 kDa que, en el aparato de Golgi, es procesado por una convertasa de tipo furina en el sitio denominado S1 y genera dos fragmentos que se mantienen asociados no covalentemente y que forman un receptor heterodimérico en la superficie celular (Fig. I.9; Fortini, 2001). Los ligandos del Notch son proteínas transmembrana y por tanto la señalización se produce por contacto célula-célula. Se han identificado diferentes ligandos de Notch, que globalmente, se han denominado ligandos DSL (por Delta y Serrate en *Drosophila* y Lag-2 en *C. elegans*; Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006). En mamíferos se han identificado 5 ligandos DSL: tres de los cuales están estructuralmente más relacionados con Delta (Delta 1, 2 y 4) y dos son más similares a Serrate (Jagged1 y 2). Después de la unión con el ligando, se produce la liberación del dominio extracelular del receptor Notch (NECD) por la acción de proteasas extracelulares de la familia ADAM/TACE en el sitio S2 (Fig. I.9). En ausencia de unión al ligando, las repeticiones del dominio extracelular LIN-12/Notch (LNRs) previenen el procesamiento en el sitio S2 (Le Borgne et al., 2005). La ruptura en el sitio S2 genera una forma activada del receptor notch unida a la membrana. El péptido así formado, que carece de dominio extracelular es procesado en el sitio S3, situado dentro del dominio transmembrana, por el complejo γ -secretasa. Este proceso permite la liberación al citoplasma del dominio intracelular de Notch, denominado NICD (Notch Intracellular Domain; fig. I.9). Se ha demostrado que NICD, sin cascadas de señalización, se localiza en el núcleo y se asocia con proteínas con dominios de unión a ADN denominadas CSL (de CBF1, promotor binding factor1 en humanos; Supressor of Hairless en *Drosophila* y Lag-1 en *C. elegans*) que regulan la expresión de un serie de genes diana (Fig. I.9; Lecourtois and Schweisguth, 1998, Schroeter et al., 1998). La vía de señalización dependiente de CSL se denomina la vía canónica del receptor Notch (Kopan, 2002). También se ha descrito en diferentes sistemas, activación de la vía de Notch independiente de CSL (Matsuno et al., 1995, Martinez Arias et al., 2002). Las dianas de transcripción de Notch, aún no han sido completamente establecidas. Sin embargo se sabe que la activación de la vía de Notch mediada por Supressor of Hairless incrementa la transcripción de represores transcripcionales hélice-bucle-hélice (bHLH), pe de la familia *enhancer of split* (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2006).

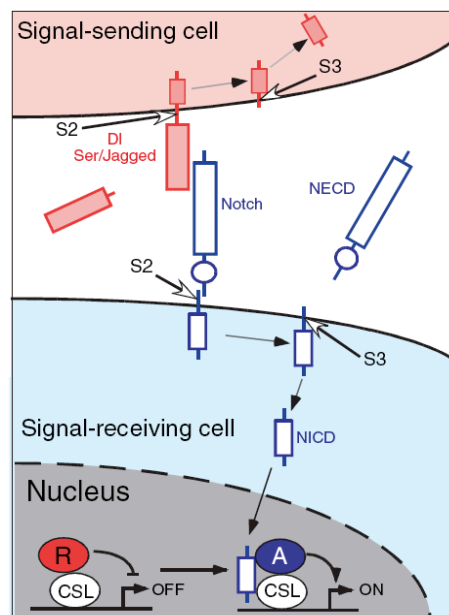


Figura I.9. Vía de señalización mediada por el receptor Notch. La activación de Notch, tras la unión con el ligando Delta, requiere de dos cortes proteolíticos del receptor (S2 y S3). Después del corte S3, el dominio intracelular de Notch (NICD) se transloca al núcleo. La asociación de NICD con las proteínas de unión a ADN, CSL, perturba al complejo co-represor de CSL (R) y promueve el ensamblaje del complejo co-activador CSL (A), mediando de ese modo la activación transcripcional. Los ligandos DSL (rosa) pueden ser procesados al igual que Notch, primero en el sitio extracelular S2 y posteriormente en dominio de membrana en S3. CSL; CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1; DI, Delta; N, Notch; NECD, dominio extracelular de Notch; NICD, dominio intracelular de Notch; Ser, Serrate. Imagen tomada de Le Borgne y col, 2005 (Le Borgne et al., 2005).

El gen que codifica para el receptor Notch se identificó en *Drosophila*, donde se observó que la falta de función parcial (haploinsuficiencia) originaba muescas o cortes (notches) en los márgenes de las alas de las moscas (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Notch adquirió su notoriedad en los análisis clásicos de mutantes de falta de función letales, realizados en embriones de *Drosophila*, donde se observó que las células destinadas a ser epidermis cambiaban su determinación adquiriendo un destino neural (Poulson, 1937).

Además Notch participa reiterativamente en el desarrollo de la retina en *Drosophila* y en el desarrollo de los precursores de los órganos sensoriales externos o SOP (Sensory Organ Precursor) del individuo adulto en *Drosophila*. La señalización mediada por Notch es un mecanismo conservado, que es empleado en los metazoos en multitud de procesos del desarrollo (Lai, 2004).

6.1. Endocitosis y señalización mediada por Notch.

Una de las primeras evidencias, de que la endocitosis juega un papel muy importante en la señalización mediada por Notch, se obtuvo en los análisis del mutante en dinamina (*shi^{ts}*) de *Drosophila* (Poodry, 1990, Chen et al., 1991, van der Bliek and Meyerowitz, 1991). El bloqueo de la

endocitosis dependiente de dinamina bloquea la señalización a través de Notch, tanto si se produce en las células emisoras de la señalización (que expresan los ligandos DSL) como en las células que reciben la señal (que expresan el receptor Notch; Seugnet et al., 1997). Esto se debe a que en *Drosophila* para la activación de Notch se requiere que el ligando sea endocitado por la célula señalizadora, aunque hasta la fecha no se conoce bien la causa de este requerimiento (Le Borgne et al., 2005). La endocitosis del receptor en la célula que recibe la señal podría actuar a dos niveles diferentes. En primer lugar, tras la unión del ligando y la proteólisis en el sitio S2, hay indicios de que el corte en el sitio S3 que libera la forma activa intracelular, podría requerir la endocitosis del receptor, e incluso podría tener lugar en un compartimento intracelular (Gupta-Rossi et al., 2004). Pero además Notch está sujeto a endocitosis en ausencia de ligando, pudiendo dirigirse en este caso hacia la vía degradativa lisosomal dependiente de Hrs o hacia la vía de reciclado de vuelta a la membrana. En la decisión de la vía hacia la que se dirige Notch participarían las E3-Ubiquitin-ligasas Nedd4 y Su(dx), que promoverían su degradación (Wilkin et al., 2004, Sakata et al., 2004), y Dx, que antagonizaría la degradación de Notch promovida por Nedd4 y Su(dx), dando lugar a activación independiente de ligando cuando se sobre-expresa (Fig. I.10; Sakata et al., 2004). Los estudios de localización indican que Su(dx), Nedd4 y Dx están presentes en los endosomas, pero es posible que actúen también en la superficie celular para mediar la endocitosis de Notch (Le Borgne et al., 2005).

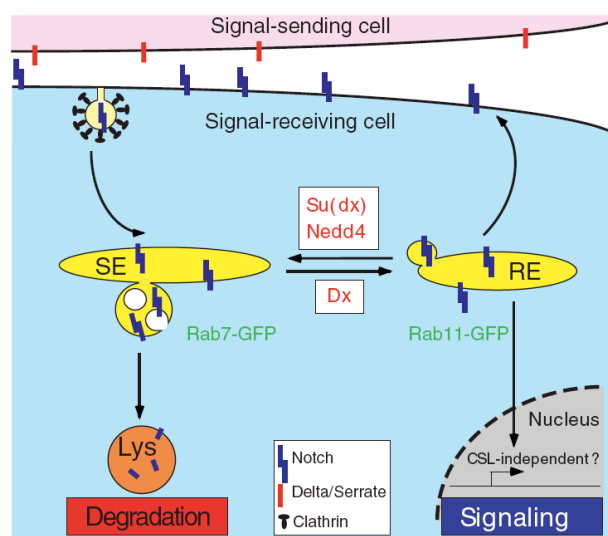


Figura I.10. Dx y Su(dx)/Nedd4 actúan antagónicamente en la regulación del tráfico endosomal de Notch. Modelos de la regulación de la señalización mediada por Notch. Después de la endocitosis del receptor Notch (SE, sorting endosoma) Notch puede ser dirigido para su degradación hacia compartimentos marcados como Rab7-GFP positivos. Este tráfico vesicular parece estar regulado por Su(dx) y Nedd4. Dx parece actuar antagónicamente a Su(dx) y Nedd4 dirigiendo a Notch hacia endosomas de reciclaje (RE). Estos procesos de

tráfico celular pueden promover una activación de Notch independiente de ligando (DSL) y de CSL. Imagen tomada de Le Borgne, 2005 (Le Borgne et al., 2005).

Estos resultados sugieren que la endocitosis del receptor Notch puede constituir un punto de regulación de la intensidad de la señal, dado que no solo afecta a los niveles del receptor, sino que puede afectar a la señalización de Notch, tanto positiva como negativamente dependiendo del contexto (Le Borgne et al., 2005).

OBJETIVOS

Objetivos

Nuestro grupo, de reciente creación, se interesa fundamentalmente por las alteraciones genéticas que dan lugar a patologías del organismo que afectan al sistema nervioso y más concretamente a la retina de *Drosophila*, modelo de nuestro estudio.

Dentro de este interés general, hemos abordado en esta tesis doctoral el estudio de la única mutación no letal en la cadena pesada de la clatrina, el alelo *Chc⁴* de *Drosophila melanogaster*.

Nuestro trabajo parte de la hipótesis central de que debido a las múltiples funciones de la clatrina en nutrición celular, señalización y transmisión sináptica, un mutante subletal es idóneo para determinar cuáles de estos procesos están críticamente determinados por la endocitosis, y en especial el efecto sobre la supervivencia celular y neuronal a largo plazo de alteraciones en endocitosis.

Partiendo del escaso conocimiento que se tiene sobre el alelo *Chc⁴*, nuestros objetivos han sido:

Primero, caracterizar la mutación a nivel molecular y celular.

Segundo, determinar si el mutante presenta alteraciones en la viabilidad de las células de la retina y en caso afirmativo caracterizarlas.

Tercero, estudiar el desarrollo de la retina determinando qué procesos transcurren con normalidad y cuáles se ven alterados por la mutación.

Cuarto, investigar las causas y el curso de las alteraciones encontradas en la retina.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Todos los reactivos empleados en la preparación de las distintas soluciones y tampones han sido de grado analítico o de grado apto para su uso en biología molecular.

1. *Drosophila melanogaster*.

1.1. Condiciones estándar de cultivo de *Drosophila*.

Las moscas se cultivaron en un medio compuesto de 10% de levadura, 7,5% de azúcar, 3,5% de harina de trigo, utilizando 0,6 % de ácido propiónico como antimicótico y 1,25% de agar para solidificar el medio.

Para los estudios realizados en esta tesis las moscas se crecen en una cámara de 25° C de temperatura y un 60% de humedad relativa, bajo un ciclo de 12 horas luz-12 horas oscuridad. Otras condiciones de temperatura usadas se detallan en el apartado 1.3. Cuando a lo largo de la tesis no se mencionan las condiciones de temperatura, significa que las moscas se crecieron a 25° C.

1.2. Modificaciones de la iluminación.

Condiciones de luz intensa. Después de una puesta de 48 horas en condiciones de fotoperiodo normal, los viales se vacían de adultos y se depositan bajo una fuente de iluminación, que contiene una bombilla de 60 vatios a una distancia de 30 cm, y que está acoplada al fotoperiodo de 12 horas luz-12 horas oscuridad de la cámara. Las moscas se mantienen bajo éstas condiciones de iluminación hasta la disección.

Condiciones de oscuridad. Después de una puesta de 48 horas en condiciones de fotoperiodo normal, los individuos adultos se trasladan a un vial con comida fresca y el vial donde está la puesta se recubre con papel de aluminio y se mantiene en oscuridad permanente. Cuando comienzan a eclosionar los adultos del pupario, procedentes de los viales mantenidos en oscuridad, se vacían los tubos en la cámara oscura, y cada 48 horas se pasan los adultos que han eclosionando a un vial nuevo. Los animales se mantienen en viales recubiertos de papel de aluminio en condiciones de oscuridad continua hasta que son diseccionados.

1.3. Modificaciones de la temperatura.

Cultivo a 18° C. Las moscas se crecen en una cámara de 18° C de temperatura y un 60% de humedad relativa bajo un ciclo de 12 horas luz-12 horas oscuridad.

Cultivo a 28° C. Las moscas se cultivan en una estufa mantenida a 28° C de temperatura, que contiene un recipiente de agua para facilitar la humedad en el ambiente y oscuridad continua.

Choque térmico a 31° C. Los viales que contienen las moscas se pasan a un baño de agua previamente calibrado a 31° C durante 6 horas.

1.4. Líneas de *Drosophila melanogaster* empleadas.

Las líneas de *Drosophila melanogaster* que se han usado en el desarrollo de esta tesis se describen a continuación en las tablas M1-M4.

Tabla M.1. Cepas control y balanceadoras.

Nombre	Genotipo	Origen	Referencia	Observaciones
Oregon R	Silvestre	M. Cervera		
yellow white	<i>y, w;;</i>	M. Cervera		Parental de las líneas transgénicas
white 1	<i>w¹;;</i>	Bloomington Stock Centre, n° 145	(Lindsley and Zimm, 1992)	Control negativo para secuenciación del gen <i>Chc</i>
Doble balanceada y doble marcada	<i>y, w; If/CyO; MKRS/ TM6,Tb</i>	M. Cervera		Utilizada en el mapeo de las inserciones de los elementos P en las líneas transgénicas generadas

Tabla M.2. Líneas mutantes.

Nombre	Genotipo	Origen	Referencia	Observaciones
<i>y w Chc⁴</i>	<i>y, w, Chc⁴/ FM7C;;</i>	J. Vinós	(Bazinet et al., 1993)	Probablemente <i>w¹</i>
<i>cho² Chc⁴</i>	<i>cho², Chc⁴/ FM7C;;</i>	J. Vinós	J. Vinós sin publicar	<i>cho²</i> marcador larvario (tubulos de Malpigio color chocolate)
<i>Chc⁴</i>	<i>Chc⁴/ FM7C;;</i>	Esta tesis	Esta tesis	
Rescate <i>Chc⁴</i>	<i>y, w, Chc⁴; P{CHC3-A2 mw⁺}/+;</i>	J. Vinós	(Bazinet et al., 1993)	<i>Chc⁴</i> no es separable de la inserción que contiene el gen <i>Chc⁺</i>

Notch-fa-g62	$sc^l, z^l, N^{fa-g62};;$	Bloomington Stock Centre nº 102	(Ramos et al., 1989), (Miller and Cagan, 1998)	Alelo que afecta principalmente a la retina pupal
Notch-fa-g62 Chc ⁴	$sc^l, z^l, N^{fa-g62}, Chc^4/FM7C;;$	Esta tesis	Esta tesis	
Notch-ts	$y^l, N^{l1N-ts1}, g^2, f^l/C(1)DX, y^l, w^l, f^l;;$	Bloomington Stock Centre nº 2533	(Shellenbarger and Mohler, 1975)	Alelo hipomorfo dependiente de temperatura
Notch-ts Chc ⁴	$y^l, N^{l1N-ts1}, g^2, Chc^4/FM7C;;$	Esta tesis	Esta tesis	
Notch-nd3	$N^{nd3}/FM6;;$	A. Baonza	(Wesley and Saez, 2000)	Antimorfo
Notch-nd3 Chc ⁴	$N^{nd3}, Chc^4/FM7C;;$	Esta tesis	Esta tesis	
Notch 54/9	$y, w, Df(1)N^{54/9} FRT^{l8}/FM6;;$	A. Baonza	(Baonza and Freeman, 2001)	Alelo nulo. Deficiencia región 3C6-3C11
lace	$y^l, w^{67c23}; P\{lacW\}lace^{k05305}/CyO;$	Bloomington Stock Centre nº 12176	(Adachi-Yamada et al., 1999)	Síntesis de novo de fosfolípidos alterada

Tabla M.3. Líneas transactivadoras GAL4.

Nombre	Genotipo	Origen	Referencia	Observaciones
tubP-GAL4	$y^l, w^+;; P\{tubP-GAL4 mw^+\}LL7/TM3, Sb^l$	A. Ferrús Bloomington Stock Centre nº 5138	(Lee and Luo, 1999)	Activador ubicuo
act5C-GAL4	$y^l, w^+;; P\{Act 5C-GAL4 mw^+\}25F01/CyO y^+;$	Bloomington Stock Centre, nº 4414	Bloomington Drosophila Stock Center 1998.9.14	Activador ubicuo
hs-GAL4	$w^+;; P\{Hsp70.PB-GAL4 mw^+\}$	M. Calleja	(Brand et al., 1994)	Activador ubicuo a altas temperaturas
arm-GAL4	$w^+;; P\{arm-GAL4 mw^+\}$	M. Calleja	(Sanson et al., 1996)	Activador ubicuo en células imaginales y de larva
Rh1-GAL4	$; P\{Rh1-GAL4 ry^+\}; ry$	J. Vinós	(Mollereau et al., 2000)	Activador en fotorreceptores
Chc ⁴ Rh1-GAL4	$y, w, Chc^4/FM7C; P\{Rh1-GAL4 ry^+\};$	Esta tesis	Esta tesis	
GMR-GAL4	$w; P\{GMR-GAL4 mw^+\};$	M. Freeman stock 1104 Bloomington	(Ellis et al., 1993), (Hay et al., 1994), (Freeman, 1996)	Activador en todas las células de la retina
Chc ⁴ GMR-GAL4	$y, w, Chc^4/FM7C; P\{GMR-GAL4 mw^+\};$	Esta tesis	Esta tesis	

GAL4-54	<i>w; P{GAL4⁵⁴ mw⁺};</i>	R. Cagan	(Lee and Luo, 1999)	Activador en células pigmentarias de la retina
Chc ⁴ GAL4-54	<i>y, w, Chc⁴/FM7C; P{GAL4⁵⁴ mw⁺};</i>	Esta tesis	Esta tesis	
Elav-GAL4	<i>w, P{elav-GAL4 mw⁺};;</i>	A. Ferrús	(Lin and Goodman, 1994)	Activador panneuronal
Elav-GAL4 UAS-GFP	<i>w;; P{elav-GAL4 mw⁺ P{UAS GFP}}</i>	J. Vinós	J. Vinós sin pulicar	
Chc ⁴ Elav-GAL4 UAS-GFP	<i>cho², Chc⁴/FM7C; ; P{elav-GAL4 mw⁺ P{UAS GFP}/ TM3</i>	Esta tesis	Esta tesis	

Tabla M.4. Líneas efectoras UAS.

Nombre	Genotipo	Origen	Referencia	Observaciones
p35	<i>w; P{UAS p35 mw⁺};</i>	J. Vinós	(Zhou et al., 1997) (Hay et al., 1994)	Proteína antiapoptótica de baculovirus
Diap 1	<i>w; P{UAS Diap1 mw⁺}/ CyO;</i>	G. Morata	(Hay et al., 1995)	Inhibidor de proteínas apoptóticas
Clc-GFP	<i>w; P{UAS Clc-EGFP}/ CyO;</i>	I. Mellman	(Chang et al., 2002)	Proteína de fusión. Marcador de células de Garland para ensayo de endocitosis
cho ² Chc ⁴ Clc-GFP	<i>cho², Chc⁴/FM7C; P{UAS Clc-EGFP}/ CyO;</i>	Esta tesis	Esta tesis	
Notch completo	<i>y, w;; P{UAS N^{FL} mw⁺ }</i>	J. F. de Célix	(Zecchini et al., 1999)	Receptor Notch completo
Notch dominate negativo 1	<i>w; P{UAS N^{ECN} mw⁺}/ CyO;</i>	A. Baonza	(Brennan et al., 1999) (Lawrence et al., 2000)	Delección de la región citoplásmica

2. Cepas bacterianas.

Para la transformación y crecimiento de plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli DH5a*, cuyo genotipo describe Sambrook y col. (Sambrook and Russell, 2001).

3. Plásmidos.

3.1. Vectores bacterianos.

- **psL301.** Vector utilizado para el subclonaje de fragmentos, derivado del ADN de virus bacteriofagos. Contiene un superlinker con sitios de corte único para múltiples enzimas de restricción y el gen de resistencia a ampicilina (Invitrogen).
- **pCAP^s.** Vector utilizado para el subclonaje de fragmentos obtenidos por PCR. Contiene la mutación letal CAP^s en el gen CAP (catabolite activator protein), que le impide crecer en ausencia de inserto, y el gen de resistencia a ampicilina (*PCR Cloning kit, blunt end*, Roche).

3.2. Vectores de expresión en *D. melanogaster*.

- **pUAST.** Vector derivado de elementos P que contiene extremos con repeticiones invertidas para su inserción mediada por transposición en el genoma de *D. melanogaster*. Contiene las secuencias de activación de levaduras UAS (Upstream Activating Sequences), a las cuales se une el factor de transcripción de levaduras GAL4, y el gen marcador de selección *mw⁺* (*mini white⁺*) para diferenciar las moscas que llevan el inserto por el color de los ojos.
- **pUChsIIΔ2-3.** Plásmido que aporta la expresión de la enzima transposasa en la generación de moscas transgénicas por transposición de elementos P. Se coinyecta en embriones de *Drosophila* junto a las construcciones realizadas en vectores derivados de elementos P.

3.3. Construcciones.

- **pOT2-Chc.** (Stapleton et al., 2002). Plásmido procedente de una genoteca de ADNc obtenidos a partir de embriones de *D. melanogaster* de 0-24 horas, que contiene el ADNc completo que codifica para la Cadena Pesada de la Clatrina (Chc) de *D. melanogaster* (5506 pb, nucleótidos 1553 al 7059). Porta el gen de la cloramfenicol acetil transferasa (CAM^r) que le confiere resistencia al antibiótico cloramfenicol. Adquirido de la *Drosophila Gene Collection* (<http://www.fruitfly.org/DGC/>), clon número LD43101.4.

4. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados con la ayuda del programa informático Primer 3, (http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html), (Rozen and Skaletsky, 2000) y fueron sintetizados por Isogen. Se diseñaron 8 parejas de cebadores para amplificar todos los exones codificantes del gen Chc de *D. melanogaster* (Tabla M.5).

Además hemos empleado el oligonucleótido general T3, para la secuenciación de los fragmentos clonados, cuya secuencia no se incluye.

Tabla M.5. Cebadores utilizados (F, forward 5'-3'; R, reverse 5'-3').

Nombre	Secuencia	Tamaño
ChcF1	CGCATCAGTGCTGTCCATAAC	965 bp
ChcR1	TGATCCTCTTCGGACATTCTG	
ChcF2	CCGGTCGACTGGGATAATG	860 bp
ChcR2	ATGCGAAGGGCCAAATC	
ChcF3	CTGTATGACATGGAGACGGC	921 bp
ChcR3	CAGATTCATTTCCAGCAGGC	
ChcF4	GAGCTGGTTTCGCCTCTATG	895 bp
ChcR4	TCCTCACTGCAATCAACATC	
ChcF5	GGAGGCCAAGCTGACGG	907 bp
ChcR5	TTCGTACAACCTGATTACTGATCG	
ChcF6	GATTATTCTGGACTCGTCCGTC	904 bp
ChcR6	ACGTTCCAGCCCCAAAG	
ChcF7	GCACATGGAAGGAGGTGTG	893 bp
ChcR7	AACGCTCTGTTTCCAGCG	
ChcF8	GCTGCATGTATGCACTTTAAGC	998 bp
ChcR8	CCTTTCGACACCCTCGATAC	

5. Anticuerpos y fluoróforos.

5.1. Anticuerpos primarios.

- **Anti-armadillo (ARM, N27A1).** Anticuerpo monoclonal de ratón que reacciona contra la región amino terminal de la proteína armadillo (β -catenina) de *D. melanogaster*. Usado en Inmunofluorescencia, IF, (1:10) (Development Studies Hybridoma Bank, <http://www.uiowa.edu/~dshbwww/>).

- **Anti-dominio intracelular de Notch (NICD, C17.9C6).** Anticuerpo monoclonal de ratón que reacciona contra la región intracelular del receptor Notch de *D. melanogaster*. Usado en IF (1:10) (Development Studies Hybridoma Bank).

- **Anti-caspasa 3 activada (Asp175).** Anticuerpo policlonal de conejo generado contra el fragmento de la caspasa-3 humana activada (17/19 kDa) resultante del corte adyacente al residuo de Aspártico 175 y que también reacciona con la de *Drosophila*. Usado en IF (1:50) (Cell Signaling).

5.2. Anticuerpos secundarios.

- **Alexa 488 (A11029).** Anti-IgG de ratón producido en cabra y acoplado a un fluorocromo. Utilizado en IF (1:200) (Molecular Probes).

- **Alexa 546 (A11030)**. Anti-IgG de ratón producido en cabra y acoplado a un fluorocromo.

Utilizado en IF (1:200) (Molecular Probes).

- **Alexa 546 (A11035)**. Anti-IgG de conejo producido en cabra y acoplado a un fluorocromo.

Utilizado en IF (1:200) (Molecular Probes).

5.3. Fluoróforos.

- **Texas Red-Avidina**. Avidina conjugada con un fluoróforo, cuyo máximo de emisión se encuentra en los 615 nm (Molecular Probes A-820). Utilizado en el ensayo de endocitosis en las células de Garland a la concentración de 0.2 mg/ml.

- **Naranja de Acridina**. Utilizado para marcar las células muertas. Concentración de uso 0,1 mg/ml. (Sigma).

6. Medios para cultivos celulares.

6.1. Medio M3 completo.

El medio de cultivo M3 completo está compuesto por el medio para insectos Shields and Sang M3 (Sigma S3652), 0,1% de extracto de levadura, 0,25% de peptona bacteriológica, 10% de suero fetal bovino (inactivado por calor), 10 µgr/ml de insulina, estreptomicina y penicilina. El medio se filtra por una unidad de filtración de 0,22 µm (*MILLIPORE*).

MÉTODOS

1. Biología molecular.

Los métodos generales de biología molecular, como el clonaje del ADN en plásmidos, la transformación de *E. coli*, la realización de cultivos bacterianos y las técnicas electroforéticas de ácidos nucleicos se llevaron a cabo según los protocolos que describen Sambrook y Russell (Sambrook and Russell, 2001).

1.1. Purificación del ADN.

1.1.1. Purificación de ADN plasmídico y de productos de PCR.

Para la obtención de pequeñas cantidades del ADN plasmídico de cultivos de *E. coli* se utilizó el kit *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega).

Para la extracción del ADN de una banda de gel de agarosa se utilizó el kit *QUIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol* (Quiagen).

Para la purificación de productos de PCR se utilizó el kit QUIAquick (Quiagen).

1.1.2. Purificación del ADN genómico de una mosca.

Para la preparación del ADN genómico de *D. melanogaster* se utilizó el método descrito por Gloor y col. (Gloor et al., 1993), para una sola mosca. Se machaca la mosca durante 5-10 segundos en un tubo eppendorf de 0,5 ml utilizando una micropipeta con una punta amarilla que contiene 50 µl de la solución de homogenización formada por 10 mM Tris-HCl pH 8,2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl y 200 µg/ml proteinasa K. Una vez machacada la mosca se mezcla con el líquido de la micropipeta introduciéndolo dentro de la punta repetidas veces. La mezcla se incuba 30 min a temperatura ambiente y posteriormente a 95° C 2 min para inactivar la proteinasa K. Posteriormente se le da un pulso de centrifugación para depositar los restos de tejidos al fondo del eppendorf. Esta preparación se puede conservar a 4° C durante meses.

1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones se llevaron a cabo a partir de 1 µl de la preparación de ADN de una mosca en un volumen total de 50 µl. Se utilizaron 0,5 µM de cada oligonucleótido, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 1 U de enzima Taq polimerasa DyNAzyme (Finnzymes) con 5 µl de su tampón de reacción. Se utilizó un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) y el programa de amplificación básico utilizado (con pequeñas modificaciones según el caso) fue: 94 ° C/3 min seguido de 25 ciclos de 94° C/45 s; 56° C/45 s; 72° C/1 min, y un último ciclo de elongación de 72° C/7 min.

1.2.1. Reacción asimétrica en cadena de la polimerasa para la obtención de ADN de cadena sencilla.

Para la obtención de ADN de cadena sencilla para su secuenciación se empleó la técnica de PCR asimétrica descrita por Gyllesten y Erlich (Gyllensten and Erlich, 1988). Las reacciones se llevaron a cabo a partir de una dilución 1:10 del producto de la PCR y la concentración de los cebadores que se utilizó era de 0,5 µM para uno de los oligos y de 0,005 µM para el otro oligo. Las condiciones de amplificación de las PCR asimétricas son idénticas a las descritas anteriormente y el número de ciclos de amplificación es de 30.

1.3. Secuenciación del ADN.

La secuenciación se realizó en el servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, a partir de 100 ng del ADN purificado del producto de la PCR asimétrica con el kit de QUIAquick (Quiagen), cuantificado en el espectrofotómetro *Bio Photometer* (Eppendorf, programa ADNss) y 3,2 pmoles del oligo que estaba en menor concentración en la reacción. Se secuenciaron las 2 cadenas complementarias del ADN para cada producto de PCR.

1.4. Análisis bioinformático de las secuencias.

Para diseñar la estrategia de los clonajes se utilizó el programa DNA Strider 1.2 desarrollado por Christian Marck y el programa EnzymeX 1.1. Y para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizó el programa Edit View 1.01, todo ellos soportados en el sistema operativo MacOS.

Los alineamientos simples de las secuencias de nucleótidos obtenidas con la secuencia del ADN genómico de la Cadena Pesada de la Clatrina del BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) se realizó utilizando el programa LALING disponible en el servidor del Instituto de *Genética Humana de Montpellier* ((Pearson and Lipman, 1988)<http://xylian.igh.cnrs.fr/>).

La comparación de las secuencias de *D. melanogaster* con la de *D. pseudoobscura* obtenida en el *Human Genome Sequencing Center del Baylor College of Medicine* (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/>) se llevó acabo mediante el programa BLAST (Altschul et al., 1997).

Para el estudio de las secuencias de aminoácidos de la Cadena Pesada de la Clatrina se utilizó el programa *DNA Strider 1.2*. Los alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos se realizaron con la ayuda del programa *ClustalW* (European Bioinformatic Institute, EMBL-EBI) y con el programa *CLC Free Workbench 2.2* desarrollado por la compañía CLC bio A/S para MacOS X.

1.5. Generación de los vectores de expresión pUAST-*Chc*^{wt} y pUAST-*Chc*^{A1082T}.

En la construcción *pUAST-Chc*^{wt} clonamos el ADNc completo control de la Cadena Pesada de la Clatrina, obtenido a partir de una genoteca de ADNc de *D. melanogaster* (*Drosophila Gene Collection*, clon LD43101), en el vector derivado de elementos P, *pUAST*. El ADNc-*Chc* control está clonado en el vector *pOT2* y su secuencia la obtuvimos en el *Genbank* con el número de acceso AY119615 (Fig. M.1A). El clonaje lo hemos realizado en dos pasos, empleando como vector intermediario *pSL-301*. En un primer paso subclonamos el fragmento *XhoI-XhoI* (1,2 kb), correspondiente al extremo 3' del ADNc-*Chc* (Fig. M.1D). En un segundo paso subclonamos el

fragmento *SacI-SacI* (4,8 kb) proveniente del vector *pOT2-Chc*, en el vector previamente generado *pSL-Chc3'* (Fig. M.1E). Posteriormente el ADNc completo que codifica para CHC se aisló por digestión doble con las enzimas de restricción *NotI* y *SpeI* y lo clonamos en los sitios *NotI* y *XbaI* del vector *pUAST* (Fig. M.1G).

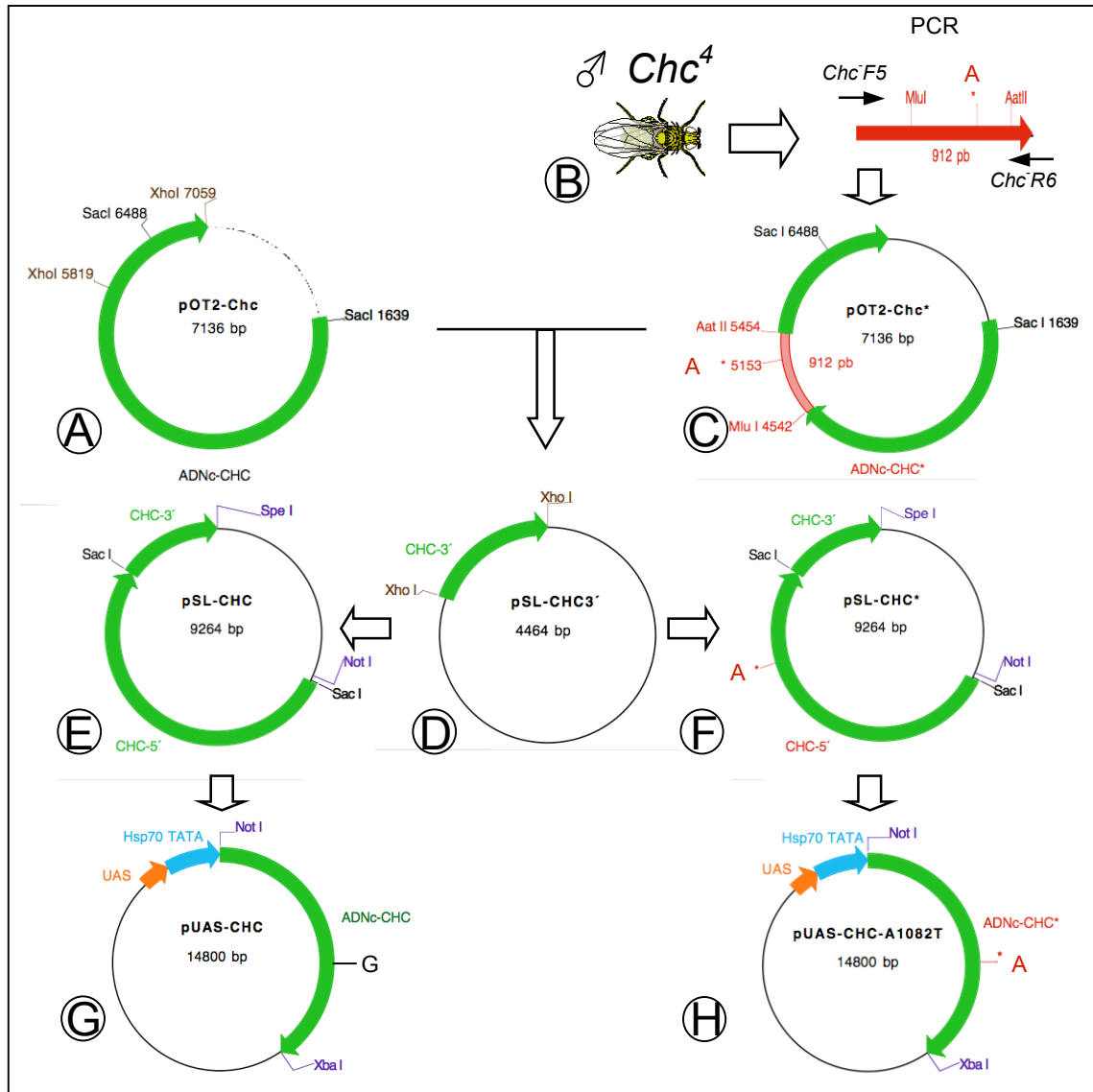


Figura M.1. Las construcciones realizadas para la generación de líneas de expresión de clatrina mutante y control se diferencian en un sólo nucleótido. La construcción control *pUAST-Chc^{wt}* (G) y mutante *pUAST-Chc^{A1082T}* (H) contienen el ADNc de *Chc* clonado en 3' de las secuencias UAS. Se diferencian en una base, siendo Guanina en la construcción control y Adenina en la mutante. Este cambio de base origina un cambio en el aminoácido 1082 de la molécula, siendo Alanina en la construcción control y Treonina en la mutante. La construcción control se generó a partir del vector *pOT2-Chc* (A), en dos pasos. Primero subclonamos el fragmento *XhoI-XhoI* (1,2 kb), en el vector *pSL-301* (D) y en un segundo paso subclonamos el fragmento *SacI-SacI* (4,8kb) en el vector generado *pSL-Chc3'* (E). Mediante doble digestión *NotI-SpeI*, clonamos el ADNc de *Chc* en el vector *pUAST* (*NotI-XbaI*).(G). Para generar la construcción mutante se amplificó el fragmento portador el cambio (B) y se clonó en el vector *pOT2-Chc* digerido con *AatII-MluI* (C), secuenciándose para

confirmar que el nucleótido 5153 era la única diferencia con el original. Los siguientes pasos del clonaje se realizaron del mismo modo que en la construcción control (**F** y **H**). UAS, Upstream Activated Sequences. Hsp70, promotor. El gen marcador *mini white* que contiene *pUAST* no está representado.

Para generar la construcción *pUAST-Chc^{A1082T}*, amplificamos por PCR a partir de 5 µl de la preparación de ADN extraído del mutante *Chc⁴*, el fragmento de 1,6 kb que contiene el cambio de nucleótido detectado en *Chc⁴* y las dianas *MluI* y *AatII* (Fig. M.1B). Para la reacción de amplificación se utilizó la enzima *Platinum Pfx DNA Polimerasa*, que posee actividad correctora 3'-5' (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron: 94° C/3min seguido de 30 ciclos de 94° C/45 s; 65° C/45s; 68° C/2 min 30 s, y un último ciclo de elongación de 68° C/7 min. El producto de la PCR se purificó mediante el kit *QUIAquick* (Quiagen) y durante 15 min a 37° C se trató con la enzima T4 DNA polimerasa (BioLabs) y 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido, en un volumen final del 20 µl para hacer romos los extremos del producto de la PCR. Posteriormente se clonó el fragmento de 1,6 kb, en el vector pCAPs, digerido con la enzima de restricción que produce extremos romos *MluI*. La secuencia amplificada por PCR se secuenció a partir de 500 ng de la preparación del ADN plasmídico y 3 pmoles de los oligos *ChcF6* y *ChcR5* (Tabla M.5, Materiales). Mediante digestión con las enzimas *MluI* y *AatII*, aislamos el fragmento de 912 pb que contenía el cambio del vector pCAPs y lo clonamos en el vector *pOT2-Chc*, digerido con las mismas enzimas, generando así el vector *pOT2-Chc^{*}* (Fig. M.1C). A partir de este punto el clonaje se realizó del mismo modo que en la construcción control (indicado en la figura M.1F-H).

1.6. Generación de líneas transgénicas.

Las líneas transgénicas se generaron utilizando la técnica de transformación mediada por elementos P descrita inicialmente por Spradling y Rubin (Spradling and Rubin, 1982). Embriones de 0 a 45 minutos de la línea *y, w*, caracterizada por tener ojos blancos en el estadio adulto, se microinyectaron con una solución que contiene 0.3 mg/ml de la construcción a insertar y 0.1 mg/ml del plásmido pUChsIIΔ2-3 que codifica la transposasa. Los embriones microinyectados (G0) que llegan a la etapa adulta se cruzan individualmente con varios ejemplares del sexo opuesto de la línea parental. Se seleccionan los descendientes (G1) que presentan color en los ojos, que indica que han incorporado la construcción que contiene el gen *mini white* junto con las construcciones de interés, que rescata parcialmente la mutación *white* de la línea parental.

Para el mapeo cromosómico de las inserciones y la generación de líneas homocigóticas se utilizaron técnicas estándar de genética de moscas.

1.7. El sistema UAS/ GAL4.

Para el análisis de las construcciones generadas durante esta tesis se utilizó el sistema UAS/GAL4 desarrollado por Brand y Perrimon (Brand and Perrimon, 1993), que permite la expresión selectiva de los genes clonados en patrones específicos celulares, de tejido y/o temporales en *D. melanogaster*. Para ello se cruzan las diferentes líneas activadoras GAL4, que expresan el factor GAL4 bajo diferentes promotores (pudiendo dirigir así su expresión en diferentes tejidos y etapas del desarrollo) con las líneas transgénicas efectoras UAS, que portan el transgen que nos interesa expresar clonado en posición 3' de las secuencias UAS, a las que se une el factor GAL4.

2. Análisis morfológico del ojo adulto de *Drosophila melanogaster*.

2.1. Microscopía óptica. Secciones semifinas de ojo adulto de *Drosophila melanogaster*.

La preparación de los especímenes se desarrolló según el protocolo descrito por Tanya Wolf (Wolff, 2000d). Las moscas se anestesian con CO₂, se sumergen 5 min en etanol al 70% y posteriormente en PBS donde son diseccionadas. Se decapitan y se secciona también la probóscide para facilitar la penetración del fijador en el tejido de interés. Una vez diseccionadas las cabezas se pasan a una solución que contiene 2% glutaraldehído (Sigma) en tampón fosfato 0.1 M pH 7,2 y se mantienen en esta solución fijadora mientras dura la disección del resto de individuos del mismo genotipo (n=3-6). Posteriormente las cabezas se pasan a una solución compuesta por glutaraldehído al 2% y tretraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, a 4° C durante 30 minutos. Se lavan una vez con el mismo tampón sin fijador durante 10 minutos. Posteriormente las cabezas se incuban durante 2 horas en hielo con OsO₄ al 2% en el mismo tampón. Las muestras se deshidratan a través de una serie de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 10 minutos cada uno y 100% 2 veces 10 minutos) y se sumergen en óxido de propileno (Serva) durante dos incubaciones de 10 minutos, para ser incluidas en una disolución 1:1 de óxido de propileno-resina plástica Durcupan (Fluka, Buchs), durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente las cabezas se embeben en la resina pura durante 4 horas, se colocan en los moldes para ser orientadas correctamente y se introducen en una estufa a 65° C durante toda la noche para que tenga lugar la polimerización de la resina plástica. Posteriormente se cortan los moldes de resina, donde están incluidas las cabezas, de tal modo que en el frente permanezca uno de los dos ojos de la muestra. Para llevar a cabo la reorientación de las muestras se incluyen en la posición adecuada en resina pura, en una cápsula cilíndrica *TAAB* de 8 mm, (Fedelco), y se depositan en una estufa a 65° C durante toda la noche.

Las secciones transversales semifinas del ojo de *D. melanogaster* de un grosor de 1µm, se realizan en el servicio interdepartamental de microscopía electrónica de la UAM (SIDI) utilizando un Reichert Ultracut S Ultramicrotome. Las secciones se tiñen durante 5 minutos a 55° C con 1% azul de metileno (Merck), 0,5% azur II (Merck) en 1% tetraborato sódico (Merck) y durante 30 segundos con fucsina básica al 1% (Merck). Las preparaciones se montan con DePeX (Serva), se visualizan en un microscopio óptico Nikon Eclipse E400 y se fotografían con una cámara Olympus DP50 utilizando los objetivos de inmersión de 60 y 100 aumentos.

2.2. Microscopía electrónica de transmisión. Secciones ultrafinas de ojo adulto de *Drosophila melanogaster*.

Se diseccionan las cabezas de las moscas por decapitación, bajo anestesia y se fijan en una solución de 3,5% glutaraldehído, 4% paraformaldehído (Sigma) en 0,1 M tampón cacodilato sódico pH 7,4 a temperatura ambiente durante 4 horas siguiendo el protocolo de Tanya Wolff (Wolff, 2000c). Las cabezas se postfijan en 1% ácido tánico (Sigma-Aldrich) en la solución fijadora descrita previamente a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación las muestras se lavan en 0,1 M tampón cacodilato sódico pH 7,4 durante 20 minutos una vez. El proceso de osmificación se lleva a cabo durante 2 horas en una solución al 2% de tetraóxido de osmio en 0,1 M tampón cacodilato sódico. Las muestras se tiñen con acetato de uranilo al 2% durante toda la noche. Las cabezas se deshidratan en concentraciones sucesivas de etanol, 30%, 50%, 70%, 90% y 100%, durante 5 minutos cada vez. Posteriormente se equilibran en óxido de propileno al 100% durante 10 minutos dos veces. La inclusión con la resina plástica Durcupan disuelta en óxido de propileno se hace lentamente en concentraciones sucesivas, del 15%, 33%, durante 2 horas, del 50% durante la noche, 66% durante 4 horas y 100% de resina durante toda la noche a temperatura ambiente. Las muestras se trasladan a los moldes adecuados que contienen resina Durcupan fresca al 100% y una vez orientadas correctamente se introducen en una estufa a 65° C durante la noche para la polimerización de la resina plástica.

Las secciones ultrafinas se cortaron en un ultramicrotomo Reichert Ultracut S Ultramicrotome, a un grosor de 60 nm, y se colocaron en rejillas de barrotes de 300-400 mesh. Las muestras se observaron en el microscopio de transmisión electrónica Jeol JEM 1010 a una tensión de 100kV y las fotografías se tomaron con una cámara digital Gatan BioScan.

2.3. Microscopía electrónica de barrido de ojo adulto de *Drosophila melanogaster*.

Para observar la morfología externa del ojo adulto de *D. melanogaster* se procesan las muestras como describe Tanya Wolff (Wolff, 2000b). Una vez anestesiados a los individuos adultos

se les disecciona en PBS. Se les amputa el abdomen, las patas, las alas y parte del tórax. La otra parte del tórax se conserva para manipular los especímenes con las pinzas evitando dañar la morfología externa de los ojos. Se fijan los tejidos durante toda la noche, a temperatura ambiente, en una solución que contiene 1% formaldehído (Sigma) y 1% glutaraldehído en tampón cacodilato sódico 0,1 M pH 7,2. Tras un lavado con agua destilada durante 10 min a temperatura ambiente, las muestras se deshidratan con una serie gradual de etanol durante 12 horas cada una a temperatura ambiente (30%, 50%, 70%, 90% y etanol absoluto). Las muestras se conservan en etanol absoluto hasta su procesamiento en el servicio de microscopía de barrido de la U.A.M. Allí se someten al Punto Crítico para secado de muestras Emitech K850, siguiendo el método descrito por Kimmel y col. (Kimmel et al., 1990) y una vez secadas las muestras se orientan correctamente en los portaobjetos y se recubren con una capa de oro utilizando el Sputter Caoter SC 502. Posteriormente las cabezas de las moscas se visualizan en el microscopio electrónico de barrido Philips XL30, acoplado al analizador EDAX DX4i.

3. Análisis de la retina pupal de *Drosophila melanogaster*.

3.1. Determinación de la madurez de la retina pupal.

Para determinar el grado de madurez alcanzado por la retina pupal, se seleccionan los individuos en el momento de la secreción del pupario (pre-pupa de color blanco), y se incuban a la temperatura deseada, 18° C y 25° C, durante los tiempos adecuados para la obtención de retinas correspondientes a los distintos estadios de desarrollo, según la descripción de Cagan y Ready que se especifica en la Figura M.2 (Cagan and Ready, 1989a). El tiempo que tarda la retina en madurar es dependiente de temperatura como el resto de procesos de desarrollo en *Drosophila melanogaster*.

Aunque varios autores utilizan la nomenclatura de referir el grado de madurez de la retina al tiempo transcurrido, definido como horas después de la pupación, éste método tiene el inconveniente de ser dependiente por tanto de la temperatura del ensayo. En esta tesis vamos a referir el grado de madurez de la retina al porcentaje del tiempo total del desarrollo pupal transcurrido, nomenclatura descrita por Reiter y col., con lo que aunque a diferentes temperaturas el tiempo de desarrollo varía, el porcentaje de dicho tiempo es el mismo (Reiter et al., 1996).

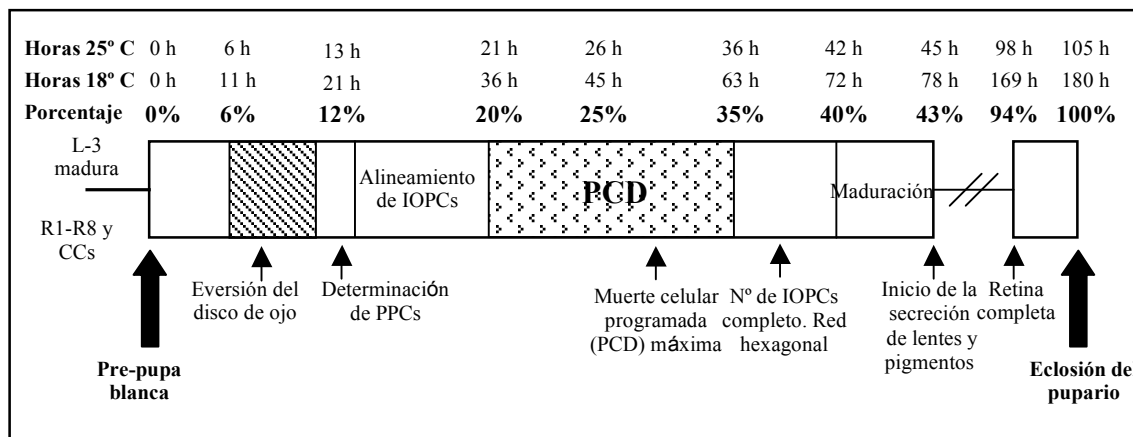


Figura M.2. Esquema del desarrollo de la retina pupal. L-3, larva de tercer estadaío. R1-R8, neuronas fotorreceptoras. CCs, células del cono. PPCs, células pigmentarias primarias. IOPCs, células pigmentarias intermatidiales. PCD, muerte celular programada (Programmed Cell Death).

3.2. Inmunofluorescencia.

La inmunodetección mediante fluorescencia en la retina pupal se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en Schneider y col. (Schneider et al., 1995) y en Tanenbaum y col. (Tanenbaum et al., 2000) con algunas modificaciones. Las retinas se diseccionan en PBS, se hace una incisión en el opérculo de la pupa para retirar por completo toda la cubierta, se seccionan los tejidos de la pupa hasta quedarnos solamente con la cabeza, a la cual se le da la vuelta como una guante, y se extraen las retinas unidas el sistema nervioso central de la pupa. Durante todo el proceso se mantiene el sistema nervioso central para manipular así las muestras evitando que las retinas puedan ser dañadas por las pinzas. Las muestras se tratan con la solución fijadora que contiene 4% de paraformaldehído en PBS durante 30 minutos, en el caso de las incubaciones con el anticuerpo anti-armadillo y anti-caspasa 3 activada, y 2% de paraformaldehído en PBS durante 15 minutos para las tinciones con el anticuerpo frente al receptor Notch. Después de la fijación las muestras se lavan 10 minutos con el mismo tampón salino y se incuban durante 30 minutos con la solución compuesta por 3% de suero de cabra, 0,1% de albúmina de suero bovino (Sigma) y 0,1% del detergente IGEPAL CA-630 (Sigma) en PBS durante 30 minutos para el bloqueo de inespecificidad, y luego se incuban con los diferentes anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo durante la noche a 4° C. Posteriormente las muestras se lavan en PBS durante 20 minutos y se incuban con el correspondiente anticuerpo secundario, diluido 1:200 en la solución de bloqueo, durante una hora a temperatura ambiente y finalmente se lavan en PBS durante una hora a temperatura ambiente (cambiando tres veces el PBS). Las preparaciones se montan en el medio Vectashield (Vector Laboratories) y se visualizan en un microscopio confocal invertido Leica (LEICA-TCS SP2-DM

IRE 2).

Parte de las inmunofluorescencias se llevaron a cabo durante la estancia breve disfrutada en el laboratorio del Dr. Marcos González Gaitán, en el Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresde, Alemania. El protocolo desarrollado fue el descrito anteriormente, exceptuando que las retinas se montaron en *Mowiol* (Molecular Probes) y se visualizaron en un microscopio confocal invertido Olympus.

3.3. Detección de muerte celular mediante tinción con Naranja de Acridina.

Las retinas junto con el sistema nervioso central de las pupas se diseccionan en tampón PBS siguiendo el método descrito por Tanya Wolff (Wolff, 2000a) y se incuban durante dos minutos a temperatura ambiente con una solución que contiene 0,1 mg/ml Naranja de Acridina (Sigma) en PBS según el protocolo desarrollado por Spreij (Spreij, 1971; Reiter et al., 1996). Posteriormente las muestras se lavan en PBS, se montan en un portaobjetos y rápidamente se fotografían con la cámara Olympus DP50 acoplada al microscopio óptico de fluorescencia Nikon Eclipse E400.

3.4. Determinación del número de células pigmentarias interomatifidiales sobrantes por omatidio.

El número de IOPCs se determinó a partir de fotografías de microscopía confocal de retinas al 40% de su desarrollo teñidas con el anticuerpo N27A1 anti-armadillo.

Cada omatidio está rodeado por 9 IOPCs, de las cuales 6 son compartidas entre dos omatidios y 3 entre tres omatidios. Por ello, por cada omatidio hay 4 IOPCs en la retina ($6/2 + 3/3$ IOPCs).

Para determinar el número de IOPCs, por tanto, se asignó la mitad de cada IOPC compartida entre dos omatidios a cada uno de ellos, y un tercio de cada IOPC compartida entre 3 omatidios. En animales control, el número resultante es de $4,06 \pm 0,03$, indicando la precisión del proceso de muerte celular programada, que sólo comete un error cada 16 omatidios, es decir una célula sobrante cada 66 IOPCs.

4. Ensayo celular de endocitosis.

Se seleccionan larvas de tercer estadio, y se sumergen en medio M3 completo para proceder a su disección. Con unas pinzas planas se sujeta a la larva por los ganchos de la boca y con unas pinzas afiladas se hace un corte a una altura de 1/3 aproximadamente de la boca de la larva. Se rasgan los 2/3 posteriores de la larva con un movimiento rápido de las pinzas afiladas, quedando al

descubierto el tubo digestivo de la larva. Se corta la sección del tubo digestivo que comprende el esófago y el proventrículo en cuya periferia se encuentran las células de Garland, formando un racimo de aproximadamente 20 células por individuo con forma ovoide (Demerec, 1994) y se incuban en una placa multipocillo que contiene 0.2 mg/ml Texas Red-Avidina (Molecular Probes) en el medio de cultivo M3 completo durante 1 ó 10 minutos a 25° C. Las muestras se lavan rápidamente con PBS a 4° C, y se fijan en paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a 4° C. Posteriormente se lavan en PBS durante 15 minutos a 4° C y se embeben en el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories). Las muestras se fotografían en el servicio de microscopía confocal de la UAM (SIDI), en un microscopio confocal invertido Leica (LEICA-TCS SP2-DM IRE 2), utilizando el objetivo de inmersión de 63 aumentos y un zoom de 3 aumentos bajo las mismas condiciones de láser.

Para las incubaciones de 1 minuto a 25° C las condiciones son: láser de Argón 488nm al 61%, ganancia de 397 voltios, offset al 2%, apertura de 1,40 y láser de Argón/ Helio Neón 543 nm al 72%, ganancia de 558 voltios, offset de -1% y apertura de 1,40.

Para las incubaciones de 10 minutos a 25° C las condiciones son: láser de Argón 488nm al 41%, ganancia de 418 voltios, offset al 1%, apertura de 1,40 y láser de Argón/ Helio Neón 543 nm al 42%, ganancia de 429 voltios, offset 0% y apertura de 1,40.

El análisis de las fotos capturadas se realiza mediante el software de Leica Microsystem. Se seleccionan las regiones de interés, correspondientes a una sección de las células de Garland donde se visualizan los núcleos y se cuantifica la intensidad en el canal del rojo, donde emite el fluoróforo Texas Red-Avidina. Los resultados fueron referidos como cantidad de Texas Red-Avidina endocitada por el perímetro medido en micras para cada célula de Garland (Sumatorio de intensidad en el canal rojo/ $2 \pi r$).

5. Análisis morfológico del disco de ojo mediante tinción con Sulfito de Cobalto.

Para visualizar la superficie apical de los discos de ojo se siguió el protocolo descrito en {Wolff, 2000 #217}. Se diseccionan los discos de ojo y antena procedentes de las larvas de tercer estadio en 0,1 M tampón fosfato sódico y se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en 2, 5% glutaraldehído disuelto en el mismo tampón. Los discos se lavan en agua y se incuban en 2-4% nitrato de cobalto disuelto de agua, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los tejidos se lavan brevemente en agua y se incubaron en una solución fresca de 2% sulfito de amonio disuelto en agua durante 30 segundos. Después de lavar en agua, los discos se montan en un

portaobjetos en 80% de glicerol para ser fotografiados en el microscopio óptico Nikon Eclipse E400 con la cámara Olympus DP50.

6. Análisis estadístico.

Los resultados descritos se han expresado como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante el test de la *t de Student*. Se consideró una significación estadística cuando $P < 0,05$ (* indica $P < 0,05$; ** indica $P < 0,01$ y *** indica $P < 0,005$).

7. Informática.

Para la captura de las imágenes en el microscopio óptico se utilizó el programa View Finder Little 1.0, en el microscopio confocal el software de Leica Confocal System y el Digital Micrograph 3.1 en el microscopio electrónico. Las imágenes capturadas, se han tratado con los siguientes programas para facilitar su visualización y para su presentación en esta tesis: Graphic Converter 4.5, iView MediaPro 1.5.6, Adobe Photoshop 7.0.1, Adobe Illustrator 10 y PowerPoint 2004 todos ellos soportados en el sistema operativo Mac OS X 10.4.5.

Para la realización de gráficas y el análisis estadístico se utilizó el programa Microsoft Excel 2004 para Mac OS X 11.1 y el programa GraphPrism v.3. Para las referencias bibliográficas se ha usado el EndNote 8 y para la realización de esta tesis el Microsoft Word 2004 para Mac OS X 11.1.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Determinación de la lesión molecular responsable de la mutación *Chc*⁴.

El alelo *Chc*⁴ fue identificado por el Dr. Bazinet en el año 1993, dentro del grupo de mutantes generados por el agente mutagénico Etilmetano-sulfonato (EMS), en el gen de la cadena pesada de la clatrina (Bazinet et al., 1993). El mutante *Chc*⁴ no estaba caracterizado a nivel molecular, y tampoco se conocían las alteraciones a nivel de endocitosis mediadas por dicho alelo.

Dada la utilidad del alelo mutante *Chc*⁴ en nuestros estudios de degeneración retiniana, nos hemos planteado identificar la lesión molecular responsable de la mutación. Para ello hemos secuenciado la región codificante del gen *Chc* en machos hemigóticos para el alelo *Chc*⁴ para su posterior comparación con la secuencia ya conocida del gen de la cadena pesada de la clatrina, a través del proyecto genoma de *Drosophila melanogaster* (*Drosophila* Berkeley Genome Project; Adams et al., 2000).

1.1. *Chc*⁴ presenta un cambio específico de la Alanina 1082 a Treonina.

La secuencia codificante del gen *Chc* comprende los exones 2 a 7, puesto que el primer exón incluye sólo secuencias que no se traducen. Para obtener ADN para su secuenciación, amplificamos dichos exones a partir del ADN genómico, extraído de machos *Chc*⁴ (genotipo *y, w, Chc*⁴, Tabla M.1, Materiales), usando 8 parejas de cebadores diseñados para este propósito (Tabla M.5, Materiales). A partir de cada producto de PCR y mediante reacciones de PCR asimétrica (Apartado 1.2.1, Métodos), obtuvimos ADN de cadena sencilla para su secuenciación. Cada posición fue secuenciada independientemente dos veces para cada una de las cadenas que la codifican. Para su análisis, la secuencia obtenida fue comparada utilizando el programa LALING (Pearson and Lipman, 1988; <http://xylian.igh.cnrs.fr/>), con la secuencia del gen de la cadena pesada de la clatrina del *Berkeley Drosophila Genome Project* (BDGP), número de acceso IDs: CG9020. Las diferencias encontradas entre ambas secuencias se muestran en la Tabla R.1.

En el análisis comparativo hallamos trece mutaciones silenciosas en la secuencia de nucleótidos que no alteran la secuencia polipeptídica de la cadena pesada de la clatrina, ya que afectan a la tercera base de los codones (Tabla R.1).

Drosophila melanogaster es una especie cuyos ejemplares presentan un alto grado de polimorfismo silencioso en regiones codificantes del genoma, (superior al 1 %, Moriyama and Powell, 1996). El número de polimorfismos silenciosos encontrados en el gen *Chc* es por tanto muy cercano al esperado.

		Secuencia de <i>Chc</i> BDGP		Secuencia de <i>Chc</i> ⁴	
Base	Residuo	Triplete	aa	Triplete	aa
705	116	CTC	Leu	CTT	Leu
1374	338	AAC	Asn	AAT	Asn
1485	376	CAG	Gln	CAA	Gln
1686	443	CAG	Gln	CAA	Gln
2427	690	TAT	Tyr	TAC	Tyr
2460	701	GAT	Asp	GAC	Asp
3255	966	CCA	Pro	CCC	Pro
3327	990	TCT	Ser	TCG	Ser
3384	1009	CTC	Leu	CTT	Leu
3601	1082	GCC	Ala	ACC	Thr
3768	1137	GCT	Ala	GCC	Ala
4108	1251	ACG	Thr	GCG	Ala
4524	1389	GAG	Glu	GAA	Glu
4533	1391	TTT	Phe	TTC	Phe
4611	1418	CTG	Leu	CTC	Leu
5332	1659	CCA	Pro	ACA	Thr

Tabla R.1. Análisis comparativo de la secuencia del ADN genómico codificante del gen *Chc*. En la tabla se muestran las diferencias de nucleótidos detectadas entre la secuencia del gen *Chc* obtenida a partir del mutante *Chc*⁴ y la secuencia obtenida de la base de datos (BDGP). También se indica la posición y el aminoácido para el cuál codifican. En negrita se representan las tres diferencias de nucleótidos halladas en el mutante *Chc*⁴ respecto a la secuencia control que provocan un cambio en la secuencia de aminoácidos de *CHC*.

Además detectamos tres diferencias de nucleótidos que originan también diferencias en el aminoácido especificado por el triplete (Tabla R.1, indicado en negrita). Éstas se localizan en la posiciones 3601, 4108 y 5332 del ADNc del gen *Chc*, provocando la aparición de: Treonina en vez de Alanina en la posición 1082, Alanina en vez de Treonina en la posición 1251 y Treonina en vez de Prolina en la posición 1659.

Puesto que no se dispone ya de la cepa de *Drosophila melanogaster* utilizada para originar el alelo *Chc*⁴, no es posible saber cuál o cuales de las tres diferencias encontradas se deberían a cambios inducidos en el gen *Chc* durante la mutagénesis ó simplemente a polimorfismos entre ambas cepas. Para distinguir entre ambas posibilidades y dado que la cepa originaria donde se realizó la mutagénesis estaba marcada con la mutación *white* (Campbell et al., 1991, Bazinet et al., 1993), secuenciamos los dos fragmentos que contienen los cambios detectados en *Chc*⁴ (*Chc*6 y *Chc*8, ver Tabla M.5, Materiales) en dos líneas que también llevan la mutación *white*: *y*, *w*, y *w*^l (Tabla M.1, Materiales). La comparación de las secuencias obtenidas con las del gen *Chc* de *D. melanogaster* (BDGP), y las del gen *Chc* de *Drosophila pseudoobscura* (Human Genome Sequencing Center del Baylor College of Medicine) permitió identificar un único cambio específico para el mutante *Chc*⁴.

Líneas	Aminoácido		
	1082	1251	1659
<i>y w Chc⁴</i>	Thr	Ala	Thr
<i>w¹</i>	Ala	Ala	Thr
<i>y w</i>	Ala	Thr	Pro
<i>BDGP</i>	Ala	Thr	Pro
<i>D. pseudoobscura</i>	Ala	Ala	Pro

Tabla R.2. Comparación de los aminoácidos en las posiciones 1082, 1251 y 1659 de la cadena pesada de la clatrina entre las diferentes líneas secuenciadas de *D. melanogaster* (*y w Chc⁴*, *w¹*, *y w*), la secuencia del *BDGP* y la de *D. pseudoobscura*. El análisis muestra que de los tres cambios detectados inicialmente, el único aminoácido presente en la secuencia de *Chc⁴* y ausente en todas las demás líneas es la Treonina en la posición 1082.

Los resultados obtenidos indican la existencia de polimorfismos en las posiciones 1251 y 1659 de la proteína CHC dependiendo de las líneas analizadas (Tabla R.2). Sin embargo, en la posición 1082, donde *Chc⁴* presenta Treonina encontramos invariablemente el aminoácido Alanina en todas las demás líneas de *D. melanogaster* y en *D. pseudoobscura* (Tabla R.2, indicado en rojo). Para confirmar que la Treonina no aparece en la posición 1082 del gen *Chc* en otras cepas *white* de uso común, obtuvimos la secuencia correspondiente de los mutantes *w¹¹¹⁸* y *w^{67c23}*, presentando ambas también una Alanina.

El cambio de nucleótido responsable de la mutación de Alanina a Treonina en la posición 1082, sería el paso de Guanina 3601 a Adenina (Tabla R.1). Dicho cambio es susceptible de haber sido generado durante la mutagénesis con Etilmetano-sulfonato (EMS), que a menudo origina la alquilación del O⁶ de la Guanina produciendo una transición de Guanina a Adenina (Ashburner et al., 2005).

La secuencia de la proteína CHC está altamente conservada desde levaduras hasta humanos (Kirchhausen, 2000a). La secuencia de *Drosophila melanogaster* es idéntica en un 80%, 57% y 49% a la secuencia de mamíferos, *Dyctiostelium discoideum* y de levaduras respectivamente (Bazinet et al., 1993). Debido al elevado grado de conservación evolutiva que presenta CHC, nos planteamos estudiar si la Alanina en la posición 1082 de la molécula para el género *Drosophilidae* estaría conservada en diferentes especies. Para realizar el análisis hemos comparado las secuencias polipeptídicas de la cadena pesada de la clatrina de: levaduras, plantas, nemátodos, mamíferos, y de *D. melanogaster*, mediante el programa CLC Free Workbench 2.0. El resultado de este análisis comparativo muestra que la posición equivalente a la Alanina 1082 de *D. melanogaster*, está ocupada también por una Alanina en todas las especies analizadas (Fig. R.1).

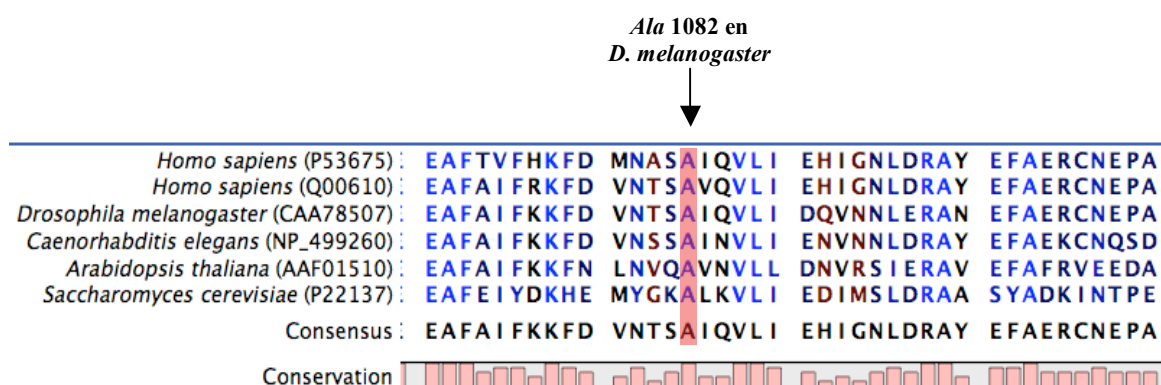


Figura R.1. Análisis comparativo de la secuencia proteica de la cadena pesada de la clatrina en diferentes especies. Alineamiento de los aminoácidos de la proteína CHC de *D. melanogaster*, *Homo Sapiens* (isoforma 1 y 2), *C. elegans*, *A. thaliana* y *S. cerevisiae*. Las posiciones ocupadas por el mismo aminoácido en todas las especies se representan en azul. El residuo Alanina-1082 para *D. melanogaster*, está conservado en todas las especies analizadas.

Posteriormente procedimos a estudiar en qué región ó dominio funcional de los descritos para la cadena pesada de la clatrina estaba localizado el aminoácido Ala-1082. Esta posición en la molécula se localiza en la región que separa el dominio proximal (“pata proximal”) del dominio distal (“pata distal”), denominada “rodilla” por la curvatura que presenta la molécula en esta zona (Fig. R.2A, flechas). Se ha postulado que esta región de la molécula permanece libre de interacciones con otras moléculas de CHC, CLC (cadena ligera de la clatrina) y de proteínas adaptadoras (Musacchio et al., 1999).

En las primeras imágenes detectadas de los trímeros de CHC, en los años 80, ya se observó una gran variabilidad en la curvatura que presentaban las cadenas de CHC dentro de un mismo trisquelión (Kirchhausen and Harrison, 1984). Posteriormente, estudios de criomicroscopía electrónica realizados a partir del ensamblaje de cubiertas de clatrina “in vitro”, han mostrado la gran flexibilidad que presenta la molécula de CHC para formar estructuras tridimensionales con diferentes ejes de simetría, muy variables en cuanto al tamaño (Fotin et al., 2004). Esta flexibilidad de la molécula residiría principalmente en la región de la rodilla y en las regiones distales de la cadena, ya que presentan variabilidad en los ángulos de giro cuando ocupan diferentes posiciones en la cubierta de clatrina (Fig. R.2B; Musacchio et al., 1999, Mousavi et al., 2004).

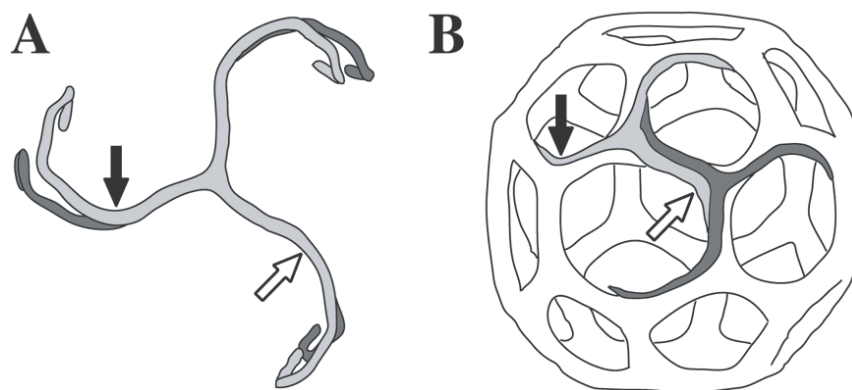


Figura R.2. Representación esquemática de la posición que ocupa el aminoácido 1082 en la cadena pesada de la clatrina. **A.** Dibujo esquemático de un trisquelión (gris claro), formado por 3 moléculas de la cadena pesada de clatrina, unidas por su extremos carboxilo-terminal. El aminoácido Alanina 1082 en *D. melanogaster* está localizado en la región de la “rodilla”, indicado mediante flechas en dos de las cadenas que conforman el trisquelión. Para apreciar la variabilidad conformacional mostrada por la región de la “rodilla” se ha superpuesto al dibujo de un trisquelión que ocupa un vértice no simétrico en la cubierta de clatrina (gris oscuro). **B.** Dibujo esquemático de una cubierta de clatrina, donde se indica la posición de los trisqueliones dibujados en la figura A. En uno de los vértices la región de la rodilla adopta un ángulo de 108° (flecha negra), mientras que en una posición equivalente el ángulo es de 120° (flecha blanca).

1.2. El cambio Alanina 1082 a Treonina es responsable de la mutación en *Chc*⁴.

Al ser el cambio de Alanina por Treonina en posición 1082 el único cambio encontrado en la molécula de clatrina del alelo mutante *Chc*⁴, nos planteamos la posibilidad de que dicho cambio fuera resultante de la mutagénesis y responsable de los fenotipos descritos en la literatura para el mutante. Dichos fenotipos incluyen subletalidad dependiente de temperatura, baja viabilidad, y esterilidad en machos (Bazinet et al., 1993).

Para determinar la responsabilidad del cambio de aminoácido identificado decidimos expresar una cadena pesada de clatrina portadora de dicho cambio en animales *Chc*⁴, empleando el sistema UAS/GAL4 (Brand and Perrimon, 1993). Para ello hemos clonado el ADNc de *Chc*, introduciendo en él el cambio de Alanina por Treonina en posición 1082 (Apartado 1.5, Métodos). La construcción se subclonó en el vector de expresión *pUAST*, que contiene las secuencias UAS de levadura, denominándose *pUAST-Chc*^{A1082T} (Fig. R.3). Como control utilizamos una construcción idéntica pero con la posición 1082 ocupada por una Alanina, *pUAST-Chc*^{wt} (Fig. R.3).

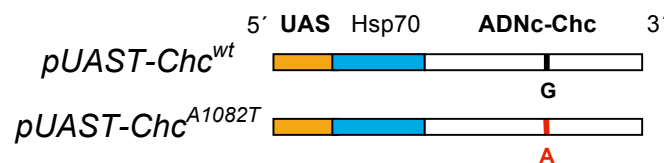


Figura R.3. Construcciones realizadas para la generación de líneas transgénicas. La construcción control $pUAST-Chc^{wt}$ y mutante $pUAST-Chc^{A1082T}$ contienen el ADNc de *Chc* clonado en 3' de las secuencias UAS. Se diferencian en una base, siendo Guanina en la construcción control y Adenina en la mutante. UAS, Upstream Activated Sequences. Hsp70, promotor. El gen marcador *mini white* que contienen ambas construcciones no está representado.

La generación de líneas transgénicas para estas construcciones se realizó mediante microinyección de embriones de la línea *yw* (Apartado 1.6, Métodos), obteniéndose varias líneas para cada construcción. En todas las líneas se determinó el cromosoma en el que se había producido la inserción por transposición, mediante técnicas de genética clásica. Se mantuvieron varias líneas en que la inserción era viable en homocigosis y se había producido en cada uno de los tres cromosomas principales (Tabla R.3).

VECTOR DE EXPRESIÓN	Líneas transgénicas	Inserción en	Inserción en	Inserción en
		<i>X</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
$pUAST-Chc^{wt}$	5	1	2	2
$pUAST-Chc^{A1082T}$	6	1	2	3

Tabla R.3. Líneas transgénicas portadoras de las construcciones Chc^{A1082T} y Chc^{wt} . Se mantuvieron varias líneas viables en homocigosis para cada cromosoma, excepto para el *X*, donde sólo se obtuvo una.

La expresión generalizada tanto de la construcción mutante Chc^{A1082T} , como de la construcción control Chc^{wt} , resultó en una altísima letalidad, siendo ésta más elevada en el caso de la construcción control, que a 18° C no producía supervivientes en tres de las cuatro líneas analizadas para dos promotores diferentes (*tubulinaP* y *actina5C*, tabla M.3, Materiales). La construcción mutante en cambio, produjo un bajo número de supervivientes a 18° C en tres de las cuatro líneas en que se expresó con el promotor *tubP*, y en las cuatro en que se expresó con el promotor *act5C*.

Para analizar el efecto de la expresión de la clatrina control y mutante en animales mutantes Chc^4 , generamos mediante cruces o recombinación, líneas Chc^4 portadoras de la construcción $pUAST-Chc^{wt}$ o $pUAST-Chc^{A1082T}$ en homocigosis (Tabla R.4).

FONDO GENÉTICO	VECTOR DE EXPRESIÓN	Líneas transgénicas	Inserción en <i>X</i>	Inserción en <i>II</i>	Inserción en <i>III</i>
<i>Chc⁴</i>	<i>pUAST-Chc^{wt}</i>	3	1	1	1
<i>Chc⁴</i>	<i>pUAST-Chc^{A1082T}</i>	3	1	1	1

Tabla R.4. Líneas transgénicas *Chc⁴* portadoras de las construcciones *Chc^{A1082T}* y *Chc^{wt}*.

La expresión de las construcciones en animales mutantes se realizó utilizando las líneas arm-GAL4 y hs-GAL4, que dirigen la expresión de construcciones UAS de forma regulada por el promotor de los genes *armadillo* (homólogo del gen *β-catenina* en mamíferos) y *Hsp70* respectivamente (Tabla M.3, Materiales). Dicha expresión en animales control no induce letalidad. La estrategia de cruces utilizada para la expresión de las construcciones en animales mutantes se muestra en la Figura R.4. En los cruces se esperaba que un 25% de la descendencia fueran machos hemigigóticos para la mutación *Chc⁴*, todos ellos portadores de una copia de la construcción UAS y del promotor, y por tanto expresarían la clatrina transgénica correspondiente. Como control, se cuantificaron los machos mutantes *Chc⁴* obtenidos respecto a los esperados en los cruces de la línea parental homocigota para la construcción UAS (Fig. R.4).

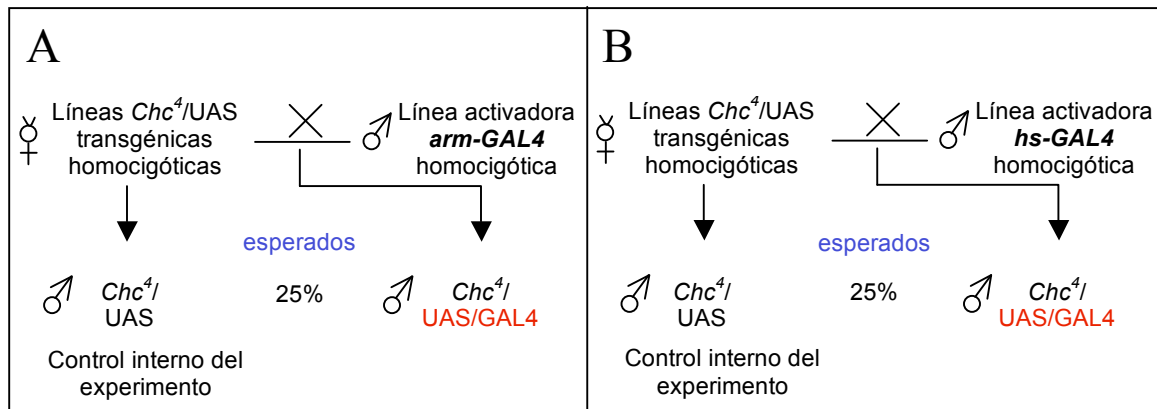


Figura R.4. Representación esquemática de la inducción de la expresión del ADNc-*Chc^{wt}* y ADNc-*Chc^{A1082T}* en moscas *Chc⁴*. Se cruzaron hembras vírgenes de las líneas transgénicas mutantes *Chc⁴* que además portaban las inserciones de la construcción control ó mutante en homocigosis en los cromosomas *X*, *II* y *III*, con machos de las diferentes líneas activadoras arm-GAL4 (A) y hs-GAL4 (B).

En las líneas control (*Chc⁴* transformadas con las construcciones, pero sin los activadores GAL4, i.e. sin expresión inducida) hemos observado una letalidad variable, entre un 26% y un 50% de los machos hemigigóticos respecto a los esperados a 25° C (Fig. R.5A y C, verde claro). En los

animales mutantes que expresan la construcción control bajo inducción del promotor arm-GAL4 se observó un rescate muy significativo de la letalidad inducida por el alelo *Chc⁴*, incrementándose en un 38,4% el número de machos mutantes obtenidos con respecto al control (Fig. R.5A, verde oscuro). La expresión de la clatrina mutante con el mismo promotor, sin embargo, no fue capaz de rescatar la letalidad inducida por *Chc⁴*, obteniéndose una disminución del 15,8% en el número de supervivientes con respecto al control que no expresa la construcción (Fig. R.5C, verde oscuro).

Debido a la sensibilidad a temperatura del alelo *Chc⁴*, la letalidad de la mutación cuando los cruces se realizan a 28° C se aproxima al 100%, siendo inusual obtener machos adultos hemigigóticos para la mutación. La expresión en estas condiciones de la construcción control *Chc^{wt}*, bajo control del promotor hs-GAL4, activo a estas temperaturas, es sin embargo capaz de rescatar la letalidad, obteniéndose un 41,4% de moscas mutantes que llevan la construcción control, respecto a las que se esperarían para un alelo neutro (Fig. R.5B). Contrariamente, cuando expresamos la forma portadora de la mutación *Chc^{A1082T}*, en las mismas condiciones, no observamos un aumento significativo (1%) en el número de mutantes supervivientes (Fig. R.5D). Por tanto la expresión de la proteína CHC control por el activador hs-GAL4, a 28° C, rescata la letalidad de los mutantes *Chc⁴* mientras que la construcción *Chc^{A1082T}* mutante no lo hace.

El hecho de que la expresión de la proteína portadora de la mutación A1082T, no rescate el fenotipo de letalidad en hemigigotos *Chc⁴*, mientras que la proteína control sí lo hace, sugiere fuertemente que la letalidad manifestada en los machos *Chc⁴* tiene su base molecular en la mutación puntual que da lugar al cambio del aminoácido Alanina por el aminoácido Treonina en la posición 1082 de la proteína CHC.

Los resultados obtenidos soportan fuertemente la hipótesis de que el único cambio específico encontrado en la secuencia de la cadena pesada de la clatrina del mutante *Chc⁴*, es responsable de la mutación.

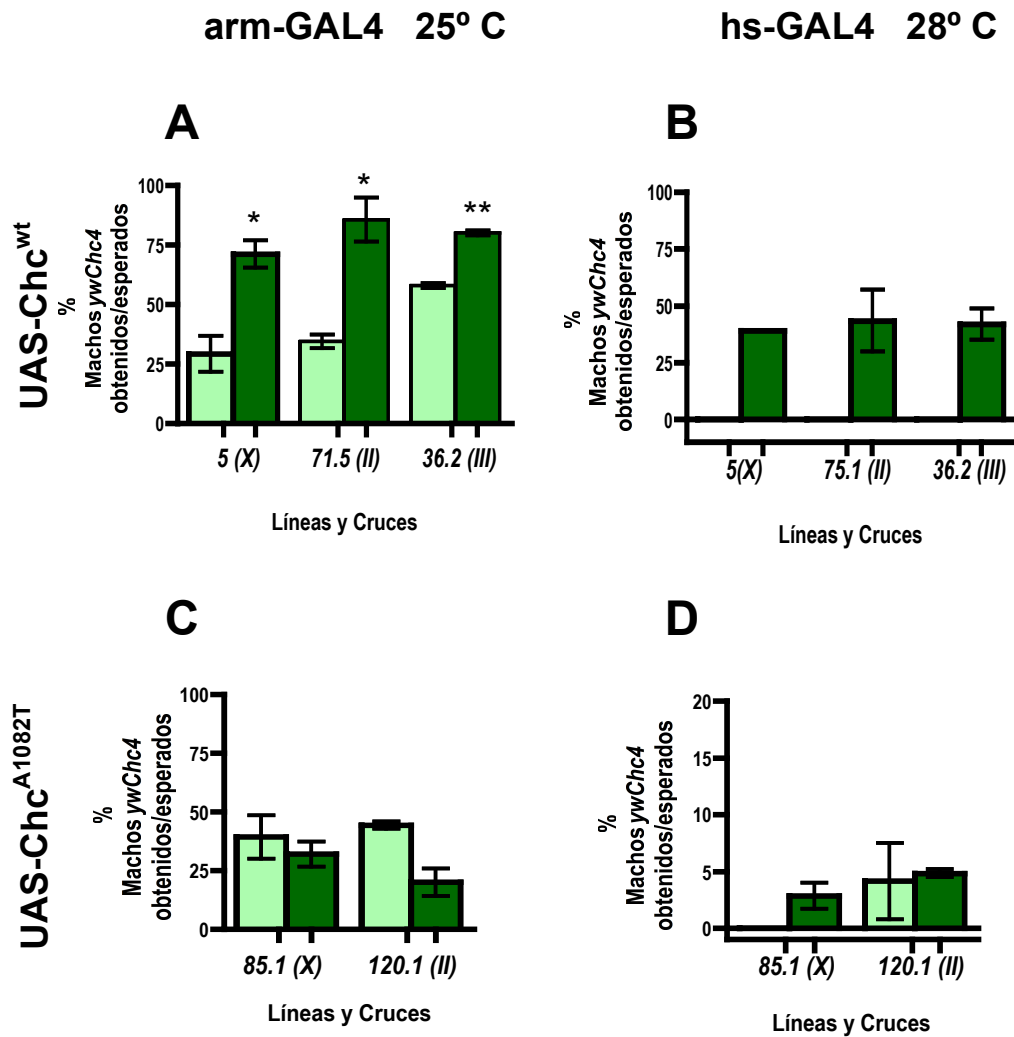


Figura R.5. La expresión de la clatrina mutada *Chc*^{A1082T} en mutantes *Chc*⁴ no rescata la letalidad. El tono oscuro de las barras denota expresión de la construcción de cadena pesada de clatrina exógena, mientras que el tono claro indica que no hay clatrina exógena. Las barras están ausentes en cruces que no produjeron descendencia del genotipo a analizar. El porcentaje de machos hemigigóticos para la mutación *Chc*⁴ obtenidos respecto a los esperados (1/4 de la descendencia) muestra un incremento significativo cuando se expresa la construcción control *Chc*^{wt}, tanto para el promotor arm-Gal4 (A), como para el hs-GAL4 (B). La expresión de la construcción mutante *Chc*^{A1082T}, con el promotor arm-Gal4 (C), o el promotor hs-GAL4 (D), no reduce la letalidad del mutante. Los datos proceden de al menos tres experimentos independientes y la significación estadística se calculó mediante la prueba de la *t de Student* (* indica $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$).

2. Alteraciones funcionales celulares de la endocitosis en el mutante *Chc⁴*.

Para determinar el efecto de la mutación *Chc⁴* en la capacidad endocítica como posible causa de los fenotipos descritos, realizamos el ensayo de endocitosis en células del mutante *Chc⁴* de *D. melanogaster*, utilizando células de Garland. Las células de Garland son nefrocitos encargados de filtrar la hemolinfa (Kosaka and Ikeda, 1983). Estas células, presentes en los estadios larvarios y también en el adulto poseen un elevado índice de endocitosis, tanto de fase fluida como mediada por vesículas recubiertas de clatrina, debido a su función. Las células de Garland se localizan entre el esófago y el proventrículo formando un racimo, de aproximadamente 20 células por individuo, poseen una forma ovoide y son binucleadas.

Como marcador de localización de la clatrina en estas células, hemos expresado el transgen *UAS-GFP-Clc* (Tabla M.4 Materiales), utilizando la línea activadora *act5C-GAL4* (Tabla M.3, Materiales) para su expresión ubicua. Estudios previos realizados *in vitro*, han demostrado que la proteína de fusión CLC-GFP, se incorpora de un modo funcional en las cubiertas de clatrina formada por los trisqueliones, que están compuestos a su vez por cadenas pesadas de clatrina (Gaidarov et al., 1999).

Para identificar las larvas de los machos hemicigóticos para la mutación *Chc⁴*, generamos la línea *cho², Chc⁴/ FM7C;P{UAS Clc-EGFP}/ CyO*; (Tabla M.4, Materiales), introduciendo la mutación recesiva en un gen implicado en la síntesis de pigmentos (*cho²*), que proporciona color marrón rojizo a los túbulos de Malpighio, un fenotipo visible. De esta manera seleccionamos las infrecuentes larvas hemicigóticas para *Chc⁴* por el cambio de color que presentan sus túbulos de Malpighio.

2.1. La localización subcelular de la clatrina mutante no está alterada.

El análisis mediante microscopía confocal de la localización de la construcción fluorescente CLC-GFP en células de Garland procedentes de animales control, en condiciones de endocitosis activa, muestra que la GFP unida a la cadena ligera de clatrina se haya fundamentalmente en la región subcortical del citoplasma, tal como había sido descrito previamente (Fig. R.6A; Chang et al., 2002). También se detectó un marcaje menos intenso en el resto del citoplasma.

La localización de la construcción fluorescente CLC-GFP no varía cuando se asocia a la clatrina mutante en células de Garland procedentes de animales *Chc⁴* (Fig. R.6B). Bajo condiciones de endocitosis activa, la fluorescencia se sitúa también mayoritariamente en la región subcortical del citoplasma, y con menor intensidad en el resto de la célula con excepción del núcleo.

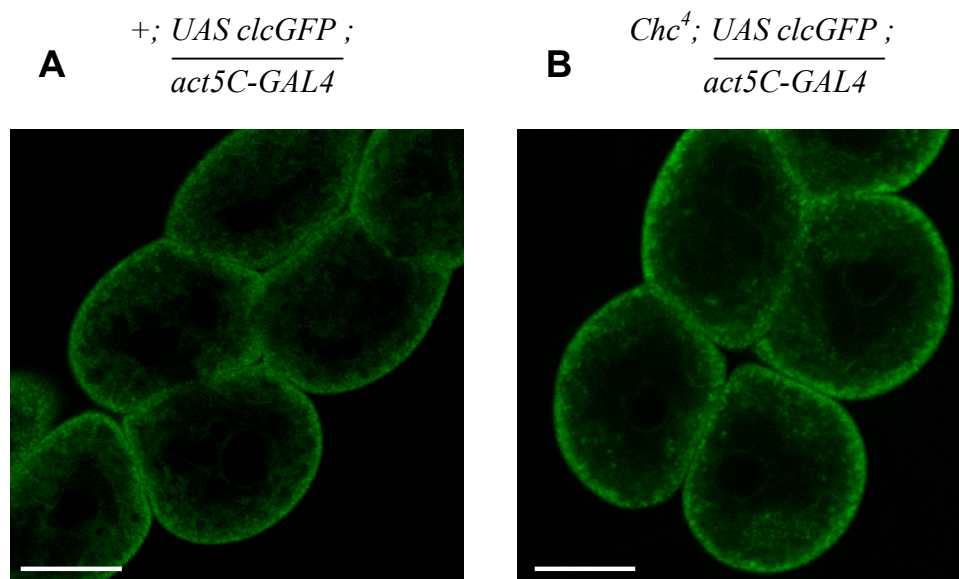


Figura R.6. Idéntica localización subcelular de la cadena ligera de la clatrina en su asociación con la cadena pesada en células de Garland procedentes de animales control y mutantes *Chc*⁴. Sección confocal de células de Garland que expresan la construcción CLC-GFP, procedentes de animales control (**A**), o mutantes *Chc*⁴ (**B**). Se observa en verde que la localización de la proteína, CLC-GFP, es principalmente periférica, localizada en la región inmediatamente interior a la membrana plasmática de las células. La barra de aumentos indica 10 μ m.

Puesto que la proteína CLC-GFP, se asocia funcionalmente con las cadenas pesadas de clatrina, en la formación de los trisqueliones que componen las cubiertas de la clatrina (Gaidarov et al., 1999), este resultado indicaría que en el mutante *Chc*⁴ la localización de la clatrina no esta alterada.

2.2. *Chc*⁴ causa una disminución de la capacidad endocítica en las células de Garland.

Para medir la capacidad endocítica de las células mutantes en clatrina, utilizamos un marcador fluorescente de endocitosis, Texas Red-Avidina (Apartado 4, Métodos). En presencia de dicho marcador, las células de Garland lo internalizan activamente por endocitosis mediada por clatrina (Chang et al., 2002).

Tras incubar las células de Garland procedentes de animales control (*w*; *UAS-GFP-Clc/act5C-GAL4*) durante un minuto con el marcador fluorescente de endocitosis a 25° C, se detecta su internalización, observándose una elevada colocalización entre la clatrina marcada con CLC-GFP (Fig. R.7A, verde) y el marcador endocítico (Fig. R.7A, rojo). También se pudo observar la presencia, en menor medida, del marcador en compartimentos endosomales que no contenían clatrina, puesto que no presentaban marcaje GFP. No se apreciaron diferencias significativas al

realizar el ensayo de endocitosis bajo estas condiciones con células de Garland procedentes de animales mutantes (*cho*², *Chc*⁴; *UAS-GFP-Clc/act5C-GAL4*; fig. R.7B).

Para incrementar posibles diferencias en la capacidad endocítica que pudieran pasar desapercibidas en tiempos cortos de incubación, realizamos ensayos de endocitosis con incubaciones largas de 10 min a 25° C. En estas condiciones, la cantidad de Texas Red-Avidina endocitada en el interior de las células procedentes de animales control es mucho mayor (Fig. R.7C). Tras 10 minutos de endocitosis continua la mayor parte del marcador internalizado no colocaliza ya con la clatrina, habiendo sido internalizado en compartimentos endosomales.

El análisis en las mismas condiciones de incubación con el marcador durante 10 minutos, realizado en células mutantes, muestra una localización similar tanto del marcador fluorescente como de la clatrina (Fig. R.7D), sin embargo la intensidad de marcaje es apreciablemente menor, sugiriendo que las células mutantes han endocitado menos marcador durante idéntica incubación.

La cuantificación de la cantidad de Texas Red-Avidina endocitada por los distintos tipos de células se determinó mediante la medición de la intensidad de la fluorescencia en el canal del rojo (Apartado 4, Métodos). El análisis muestra que las células mutantes en el gen de la cadena pesada de la clatrina *Chc*⁴, presentan una intensidad de marcaje con Texas Red cercana a la mitad que la intensidad que presentan las células control ($0,508 \pm 0,045$ SEM, n=97 para mutantes, n=90 para los controles; fig. R.7E). Por tanto en la condiciones en las que hemos realizado el estudio, las células mutantes *Chc*⁴, presentan una reducción en la capacidad endocítica del 49%. Estos resultados indican que el alelo *Chc*⁴ constituye una mutación hipomórfica, reduciendo la capacidad endocítica de las células mutantes *Chc*⁴.

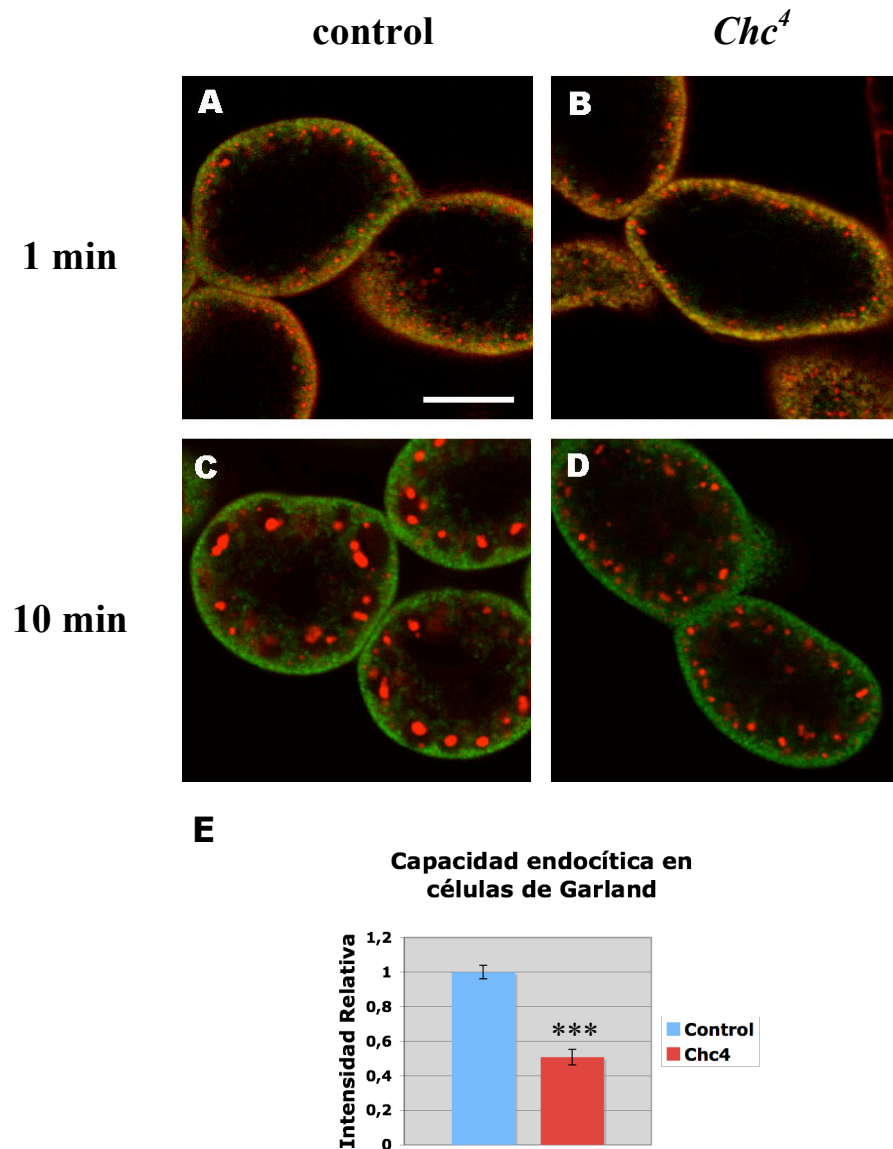


Figura R.7. Las células Garland mutantes *Chc⁴* presentan una gran disminución de su capacidad endocítica. Secciones confocales de células de Garland control (*w;UAS-GFP-Clc/ act5C-GAL4*), y mutantes (*cho², Chc⁴; UAS-GFP-Clc/ act5C-GAL4*). La localización de la cadena ligera de la clatrina está marcada con GFP y el marcador de endocitosis Texas-Red Avidina en rojo. **A** y **B**. Células incubadas 1 min con Texas Red-Avidina a 25° C. La mayoría del marcador endocitado se encuentra colocalizando con la clatrina, junto a la membrana plasmática. **C** y **D**. Células incubadas con el marcador 10 min a 25° C. En las células *Chc⁴* se observa que la cantidad de marcador endocitado es menor que en los controles. **E**. Cuantificación de la intensidad de Texas Red en células Garland control y mutantes, en las mismas condiciones que en C y D. Control n=90 células, *Chc⁴* n=97 células. Análisis estadístico mediante el test *t-Student* (***) indica $P < 0,005$. Barra 10 μ m.

3. Fenotipos detectados en la retina del mutante *Chc⁴*.

La línea de interés principal del laboratorio se centra en los trastornos de señalización que provocan muerte celular y neurodegeneración en el adulto. Debido a la adecuación de la retina de *Drosophila* como sistema modelo de muerte celular y neurodegeneración, y utilizando la experiencia acumulada en nuestro laboratorio en el estudio de la retina de *Drosophila*, centramos nuestro esfuerzo en el análisis de los efectos de la mutación *Chc⁴* en la cadena pesada de la clatrina en dicho sistema.

No hay en la literatura estudios del efecto de *Chc⁴* en el ojo de *Drosophila*, y la morfología externa del ojo en los mutantes es aparentemente normal, lo que constituye un indicio de un desarrollo retiniano sin graves alteraciones.

Nuestra primera aproximación fue realizar un análisis morfológico, mediante secciones transversales de ojos adultos procedente de mutantes *Chc⁴* (Apartado 2.1 y 2.2, Métodos). En dicho análisis hemos detectado dos fenotipos independientes, que afectan a dos poblaciones celulares diferentes de la retina.

3.1. *Chc⁴* induce neurodegeneración retiniana dependiente de actividad mediante apoptosis.

El ojo de *Drosophila* es un ojo compuesto formado por unos 800 omatidios, cada uno constituido por 8 neuronas fotorreceptoras y una veintena de células auxiliares. La disposición de las neuronas en el omatidio de una retina control se puede apreciar en la figura R.8A, donde las 7 neuronas que se pueden visualizar en una sección transversal proyectan sus rabadómeros en una disposición trapezoidal. La morfología de la retina no varía sustancialmente en animales control de acuerdo con las condiciones de iluminación a los que se les somete. En la figura R.8A mostramos el omatidio de una retina control (*y*, *w*) de una mosca de 15 días de edad mantenida en condiciones de iluminación intensa bajo un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (ver apartado 1.2, Materiales). En la figura R.8E podemos ver una retina control de la misma edad, mantenida en condiciones de oscuridad continua, y no se aprecian diferencias morfológicas significativas. Ambas mantienen su capacidad de respuesta eléctrica al estímulo visual de forma inalterada (Vinos et al., 1997).

Un animal mutante *Chc⁴* (*y*, *w*, *Chc⁴*) recién emergido tras la metamorfosis, presenta una morfología de las neuronas fotorreceptoras esencialmente normal, cuando ha sido mantenido en oscuridad total durante la metamorfosis (Fig. R.8F). Sin embargo, la exposición a condiciones de luz intensa de manera cíclica durante la metamorfosis y primeras horas de vida hace que los rabadómeros

del mutante presenten ya una cierta irregularidad de contornos, y que la zona subabdomínica se oscurezca apreciablemente (Fig. R.8B).

Los mutantes *Chc⁴* tras 15 días sometidos a iluminación, mostraron una evidente degeneración de las membranas de los rabdomeros de las neuronas (Fig. R.8C), que aparecen fuertemente desorganizados y en claro proceso de reabsorción. Conforme desaparece el rabdomero, la neurona va adquiriendo un aspecto fuertemente pignótico desembocando en su muerte celular (Fig. R.8C, flechas). En claro contraste, mutantes *Chc⁴* de 15 días de edad mantenidos en oscuridad continua (sin actividad neuronal de fotorreceptores), mantienen sus neuronas fotorreceptoras con un aspecto similar al de las retinas de moscas controles (comparar fig. R.8G y R.8E con R.8C). Estos resultados indicarían que la neurodegeneración observada en la retina del mutante requiere condiciones de actividad.

Para demostrar que la neurodegeneración dependiente de iluminación observada en el mutante se debe de hecho a la mutación identificada en el alelo *Chc⁴*, expresamos la cadena pesada de la clatrina control, en los fotorreceptores de moscas mutantes *Chc⁴*, mediante el promotor Rh1-GAL4 (Mollereau et al., 2000). En la retina de estos animales observamos un fuerte rescate, puesto que las neuronas fotorreceptoras mantienen su integridad y presentan rabdomeros de un tamaño similar al de los controles (Fig. R.8D) tras 15 días en condiciones de iluminación. La expresión de clatrina mutante, *Chc^{A1082T}*, en las mismas condiciones, fue capaz de inducir también un rescate, aunque parcial, puesto que la situación de los fotorreceptores mutantes que expresan *Chc^{A1082T}* es mejor que la de los que no la expresan (Fig. R.8H), pero presentan rabdomeros reducidos y en ocasiones con formas aberrantes. Este comportamiento es consistente con la disminución de funcionalidad de algunas mutaciones hipomórficas.

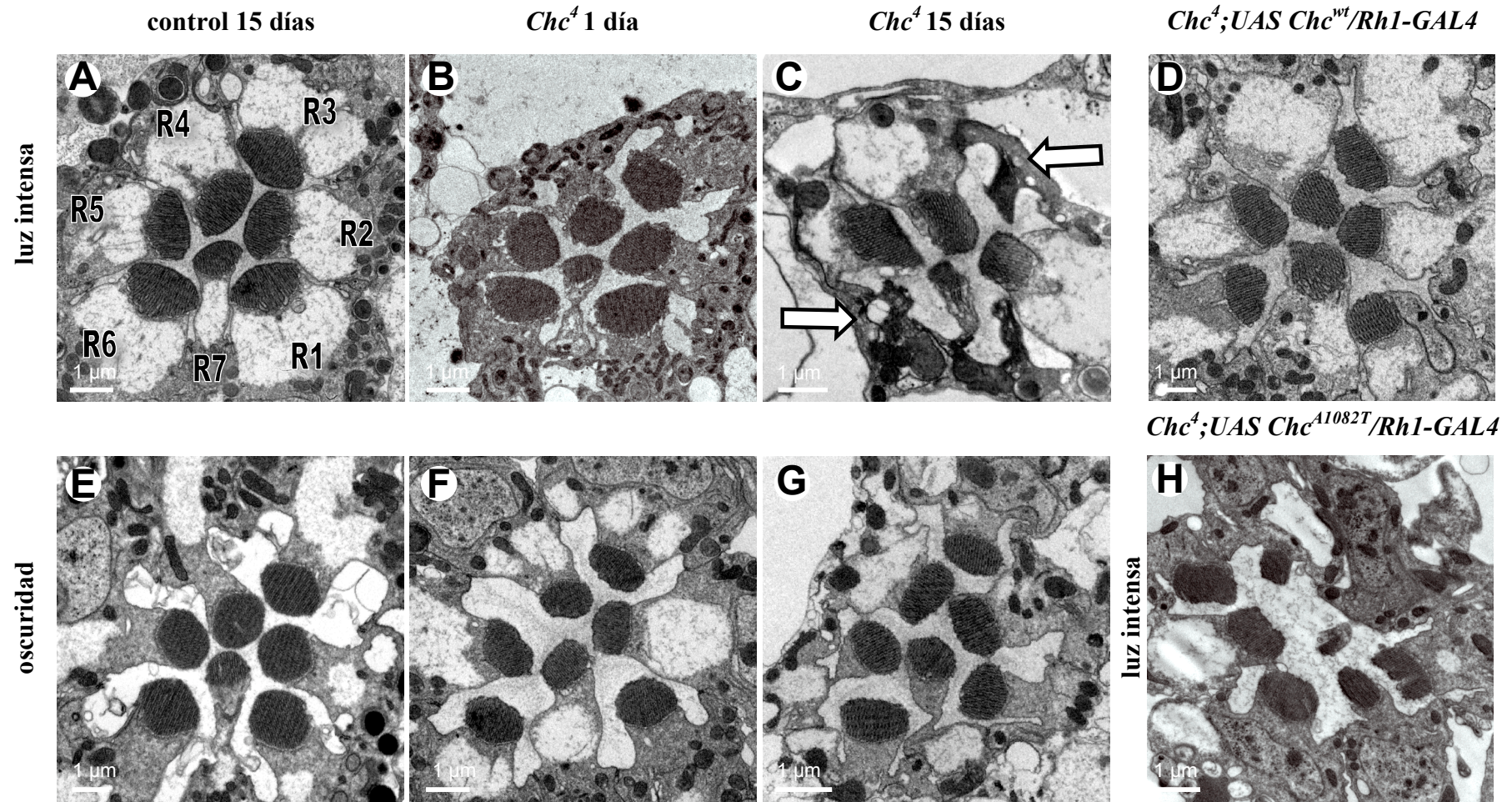


Figura R.8. La clatrina control rescata la neurodegeneración de *Chc⁴*. Microscopía electrónica de secciones transversales de retina. **A.** Control *y, w* de 15 días de edad cultivado en condiciones de luz intensa. **B.** Mutante *y, w, Chc⁴* de 1 día de luz. **C.** Mutante *y, w, Chc⁴* de 15 días de luz, donde se aprecian evidentes signos de neurodegeneración. **D.** Rescate del mutante *Chc⁴* con la construcción control (genotipo *y, w, Chc⁴; UAS-Chc^{wt}/Rh1-GAL4*). La expresión de la clatrina control suprime la degeneración retiniana inducida por la mutación. **E.** Control *y, w* de 15 días de oscuridad. **F.** Mutante *y, w, Chc⁴* de 1 día de oscuridad. **G.** Mutante *y, w, Chc⁴* de 15 días de edad en oscuridad. Se observa que la organización de los rabdomeros está preservada en los mutantes que han sido mantenidos en condiciones de oscuridad. **H.** La expresión de la clatrina mutante no suprime la degeneración retiniana (genotipo *y, w, Chc⁴; UAS-Chc^{A1082T}/Rh1-GAL4*).

La inducción de neurodegeneración por la mutación en clatrina nos llevó a plantearnos los mecanismos por los que se lleva a cabo este proceso de muerte celular de las neuronas de la retina. Una de las formas por las que tiene lugar la muerte de fotorreceptores en *Drosophila* cuando hay alteraciones de la funcionalidad, es mediante mecanismos de apoptosis (Davidson and Steller, 1998). Para comprobar si la muerte neuronal dependiente de luz observada en *Chc⁴* tiene lugar por mecanismos apoptóticos, hemos inducido la expresión de la proteína inhibidora de apoptosis p35 de *Baculovirus* (Hay et al., 1994, Davidson and Steller, 1998). La inducción de la expresión de p35 en las neuronas de la retina del mutante *Chc⁴* se llevó a cabo usando el promotor Rh1-GAL4 (Tabla M3, Materiales; Mollereau et al., 2000). Estas moscas, tras ser sometidas a 15 días de ciclo de iluminación/oscuridad, mostraron una supresión muy fuerte del fenotipo de neurodegeneración, manteniendo las neuronas una morfología normal y rabadómeros en buen estado (Fig. R.9A-C). Este resultado sugiere que la muerte de las neuronas en la retina del mutante en endocitosis *Chc⁴* tiene lugar por mecanismos apoptóticos que pueden ser prevenidos mediante el bloqueo de la activación de caspasas.

Posteriormente y puesto que estudios previos habían mostrado que en diferentes mutantes en endocitosis se suprimía la degeneración de los fotorreceptores en un fondo mutante en heterocigosis para el alelo *lace^{k05305}* (Acharya et al., 2003), nos propusimos estudiar la interacción entre *lace^{k05305}* y *Chc⁴*. El gen *lace* en *Drosophila* codifica para la subunidad LCB2 de la enzima Serin Palmitoil Coa transferasa (SPT), que cataliza el primer paso en la biosíntesis de novo de esfingolípidos (Adachi-Yamada et al., 1999). Al examinar los fotorreceptores de mutantes *Chc⁴* heterocigotos para el alelo *lace*, mediante microscopía electrónica, observamos una supresión de la degeneración retiniana (Fig. R.9D). Este resultado es consistente con la supresión observada en la degeneración retiniana de los mutantes en *dinamina* y en *arrestina 2* (Acharya et al., 2003). La mutación *lace^{k05305}* en heterocigosis no muestra fenotipo retiniano (Acharya et al., 2003) y nuestras observaciones.

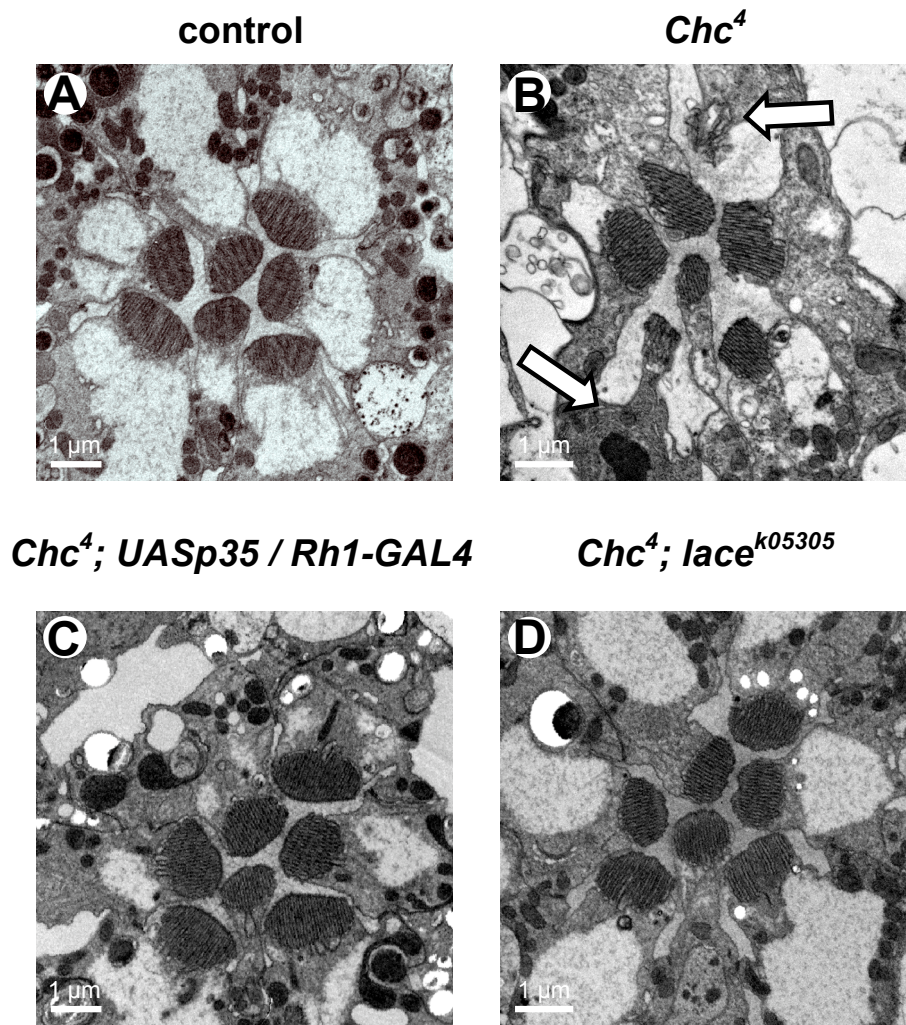


Figura R.9. La inhibición de caspasas previene la muerte de los fotorreceptores mutantes. Microscopía electrónica de secciones de animales de 15 días de edad en condiciones de iluminación. **A.** Control *y, w*. **B.** Mutante *y, w, Chc⁴* donde se indica mediante flechas la neurodegeneración de los fotorreceptores. **C.** La expresión de la proteína antiapoptótica p35, en las neuronas del mutante *Chc⁴*, suprime la degeneración (genotipo *y, w, Chc⁴; UAS-p35/ Rh1-GAL4*). **D.** Mutante *Chc⁴*, heterocigótico para el alelo *lace^{k05305}* (genotipo *y, w, Chc⁴; P{lacW}lace^{k05305/+}*). Se observa un rescate de la degeneración neuronal en *Chc⁴* alterando la composición de esfingolípidos de la membrana.

3.2. *Chc⁴* induce la muerte de las células pigmentarias interomáticas.

Además de las neuronas fotorreceptoras, el omatidio presenta una serie de células auxiliares. Las más abundantes son las células que contienen gránulos de pigmento, cuya función principal es aislar ópticamente el omatidio para mantener la señalización independiente entre omatidios, base del funcionamiento de los ojos compuestos de superposición neuronal. Las 8 neuronas de un omatidio están rodeadas a este efecto por 9 células pigmentarias interomáticas (Fig. R.10A, IOPCs), compartidas con los omatidios adyacentes. En la figura R.10B-C se muestran secciones tangenciales

semifinas (1 μm , Apartado 2.1, Métodos) de la retina de un animal control (y, w) a las 24 h de su emergencia tras la metamorfosis. En ellas se aprecia el alto grado de organización de los omatidios del ojo compuesto de *Drosophila*, dispuestos en filas y columnas siguiendo tres ejes de simetría. Los fotorreceptores de diferentes omatidios, teñidos de forma más intensa y proyectando sus rabdómeros al espacio intraomatideo, están separados por las IOPCs, que se tiñen menos con azul de metileno. En la periferia de los cortes se pueden observar las lentes, que se tiñen preferentemente con el colorante fucsina. La figura R.10D es la correspondiente sección ultrafina (50 nm) examinada mediante microscopía electrónica de transmisión (Apartado 2.2, Métodos). En ella se aprecia la disposición trapezoidal de los rabdómeros. En el detalle observamos una unión intercelular entre dos de las neuronas, responsable de mantener el aislamiento del espacio intraomatideo, cuya composición iónica diferente a la de la hemolinfa es esencial para la fotorrecepción.

La retina de los mutantes *Chc*⁴ muestra un grado de desorganización muy elevado, incluso en animales muy jóvenes, tal y como muestra la figura R.10E. Dicha desorganización es incompatible con el mantenimiento de una función visual correcta, y no es debida a la neurodegeneración de los fotorreceptores descrita en el apartado 3.1, puesto que las moscas fueron mantenidas a lo largo de su desarrollo y hasta la preparación de las muestras, en condiciones de oscuridad absoluta, que protegen de la neurodegeneración. En la figura R.10F se puede apreciar que las neuronas del mutante continúan asociadas en omatidios, y presentan rabdómeros bien desarrollados y dispuestos correctamente en trapecio. Sin embargo, entre los omatidios es frecuente observar huecos que deberían estar ocupados por IOPCs. De hecho la tinción con azul de metileno debería mostrar células que se tiñen menos, las IOPCs, y sin embargo la tinción es esencialmente homogénea en las células presentes en la retina. El análisis mediante microscopía electrónica de la correspondiente sección ultrafina muestra lo que parecen restos celulares de las IOPCs (Fig. R.10G, flechas), que pierden los contactos con las neuronas de diferentes omatidios provocando la aparición de grandes espacios entre ellos. Sin embargo, las neuronas mantienen la integridad estructural y disposición regular de sus rabdómeros (en condiciones de oscuridad), así como las uniones adherentes que existen entre ellas (Fig. R.10G, detalle).

En el mutante de 15 días de edad, la desaparición de las IOPCs es más evidente, indicando que su desaparición es un proceso progresivo (Fig. R.10H). La ausencia de IOPCs provoca que los omatidios tiendan en ocasiones a colapsarse unos sobre otros, perdiéndose totalmente la organización retiniana (Fig. R.10I). Los análisis de microscopía electrónica muestran la presencia de estructuras membranosas, probablemente remanentes de las células IOPCs, que rodean los omatidios manteniéndolos unidos (Fig. R.10J, flecha). Sorprendentemente las neuronas tienden a mantener la estructura de los rabdómeros y su disposición trapezoidal, en condiciones de oscuridad, así como las

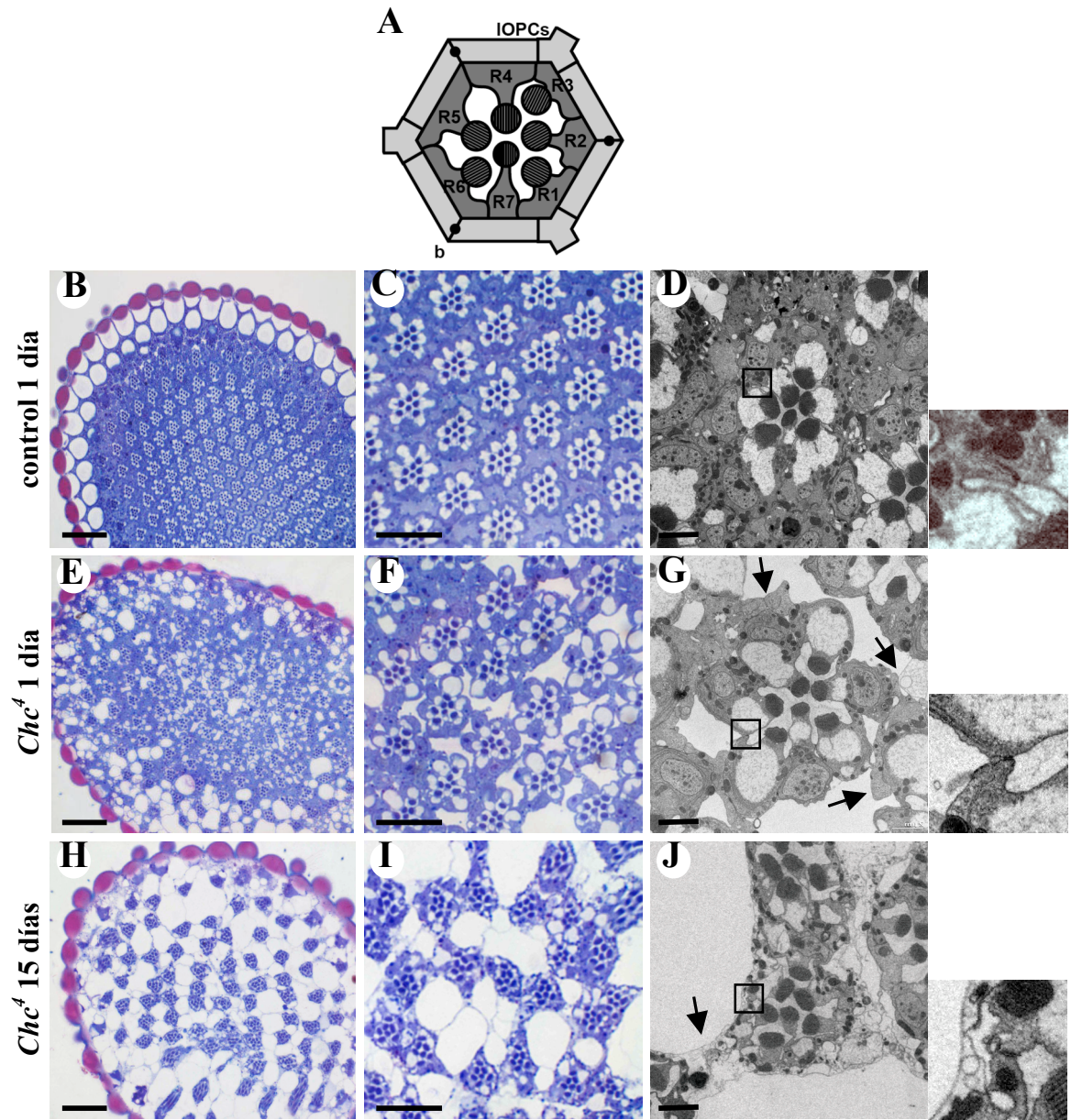


Figura R.10. La mutación *Chc⁴* induce la muerte de las células pigmentarias interommatidias y la desorganización retiniano. Secciones tangenciales de la retina de animales crecidos en condiciones de oscuridad continua. **A.** Esquema de un ommatidio adulto. En gris oscuro, R1-7 neuronas fotorreceptoras. En gris claro, IOPCs células pigmentarias interommatidias. En negro, b (bristle), en este tipo de cortes el axón de la neurona mecanosensorial de la queta, no se suele apreciar. **B y C.** Retina de un animal control (*y, w*) de un día de edad adulta. **D.** Ommatidio control y detalle de la unión intercelular entre sus neuronas. **E y F.** Retina mutante (*y, w, Chc⁴*), en las mismas condiciones, donde se aprecia la pérdida de organización y la desaparición de IOPCs. **G.** Ommatidio mutante donde se aprecia la presencia de fragmentos de IOPCs (flechas). El detalle permite apreciar que se mantiene la unión entre neuronas. **H e I.** En el mutante de 15 días de edad se aprecia un agravamiento del fenotipo debido a la progresiva desaparición de las IOPCs. **J.** Ommatidios mutantes agrupados mediante uniones membranosas (flecha). Detalle de la unión entre neuronas. Barra de secciones semifinas, 20 μm . Barra de secciones ultrafinas 3 μm .

uniones adherentes que existen entre ellas (Fig. R.10J, detalle).

3.2.1. La mutación A1082T de clatrina es necesaria y suficiente para inducir la muerte de las células pigmentarias.

Para comprobar si el cambio de Alanina por Treonina en la posición 1082 de CHC detectado en el mutante *Chc*⁴ (Apartado 1.1, Resultados), es el responsable de la muerte de las IOPCs observada en las retinas mutantes, hemos intentado rescatar este fenotipo mediante la expresión de las construcciones de clatrina generadas para este estudio (Apartado 1.5, Métodos).

La expresión generalizada de clatrina control en moscas con un promotor ubicuo resulta en fuerte letalidad (Apartado 1.2, Resultados). Sin embargo es posible expresar clatrina de forma controlada espacialmente en las células pigmentarias de la retina usando la línea GAL4⁵⁴ (Tabla M.3, Materiales), cuyo activador transcripcional dirige la expresión de los UAS-transgenes en dichas células (Lee and Luo, 1999). También se puede limitar la expresión de clatrina utilizando la línea activadora ubicua, dependiente de temperatura *hs-GAL4* (Brand et al., 1994), que a 28° C muestra un nivel de expresión de clatrina compatible con la viabilidad de los animales.

La expresión de la cadena pesada de la clatrina control en las células pigmentarias de la retina de mutantes *Chc*⁴ indujo un fuerte rescate (Fig. R.11C) de la desaparición de IOPCs que provoca esta mutación (Fig. R.11B). Similar resultado se obtuvo cuando expresamos la clatrina control en todas las células de la retina (Fig. R.11E). Estos resultados indican que la expresión de clatrina control en las células pigmentarias es suficiente para reducir su letalidad inducida por la mutación.

A diferencia de la clatrina control, la expresión de la forma mutante *Chc*^{A1082T} no induce el rescate de la muerte de IOPCs, usando el promotor específico de células pigmentarias (Fig. R.11D) o el de *heat shock* (Fig. R.11F). La expresión de clatrina mutante en moscas *Chc*⁴ presenta una variabilidad fenotípica muy alta a nivel de retina, de la misma forma que la mutación *Chc*⁴ presenta de por sí una alta variabilidad en su penetración, dado que se comporta como hipomorfo en hemicigosis, y como semi-dominante en heterocigosis (Bazinet et al., 1993). Sin embargo la diferencia existente en los fenotipos obtenidos expresando las dos formas de clatrina, que se diferencian en tan solo un nucleótido, con el mismo promotor (Comparar las figuras R.11C y D y R.11E y F), apoya fuertemente la hipótesis de que la mutación puntual del aminoácido Alanina por Treonina en la posición 1082 de la cadena pesada de la clatrina es la responsable del fenotipo de muerte de IOPCs observado en el mutante *Chc*⁴.

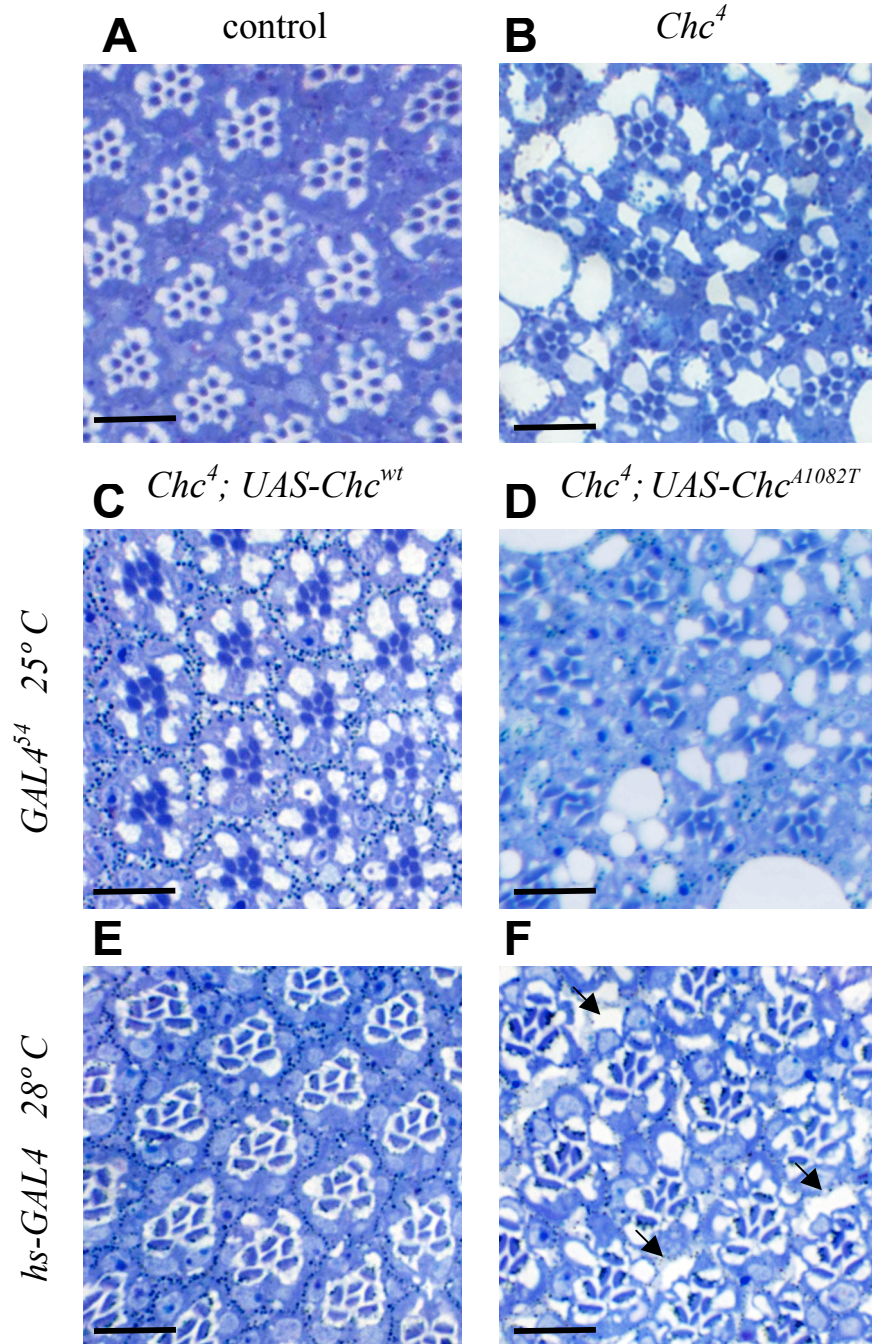


Figura R.11. La expresión de *Chc^{wt}* suprime el fenotipo de muerte de células pigmentarias en el mutante *Chc⁴*. Secciones de retina de animales de 3 días de edad mantenidos en oscuridad. A. Control, (*y, w*). B. Mutante *Chc⁴* (*y, w, Chc⁴*). C. La expresión de *Chc^{wt}* en las células pigmentarias del mutante (*y, w, Chc⁴; UAS-Chc^{wt}/GAL4⁵⁴*) rescata la muerte de IOPCs. D. En contraste, la expresión de *Chc^{A1082T}* en las mismas células (*y, w, Chc⁴; UAS-Chc^{A1082T}/GAL4⁵⁴*) no rescata el fenotipo mutante. E y F. Resultados similares se obtuvieron con el activador *hs-GAL4* a 28° C con la construcción control (*y, w, Chc⁴; UAS-Chc^{wt}/+; hs-GAL4⁵⁴/+*) y con la mutante (*y, w, Chc⁴; UAS-Chc^{A1082T}/+; hs-GAL4⁵⁴/+*). Barra 20 μm.

Como hemos indicado, la mutación *Chc⁴* presenta un efecto semi-dominante descrito inicialmente para la letalidad del alelo (Bazin et al., 1993). Hemos comprobado que la muerte de IOPCs en la retina de los mutantes también está sujeta a dicho efecto semi-dominante. El análisis morfológico de la retina de hembras heterocigotas para la mutación *Chc⁴* muestra también un alto grado de desorganización a nivel de las IOPCs, con aparición de huecos entre los omatidios (Fig. R.12B), aunque el fenotipo es menos pronunciado que en machos *Chc⁴*. El carácter semi-dominante de la mutación nos sugirió la posibilidad de inducir un fenotipo retiniano similar al de las hembras heterocigotas en animales control mediante la sobreexpresión de la forma mutante *Chc^{A1082T}*.

La sobreexpresión de clatrina con promotores ubicuos fuertes tiene un efecto deletéreo, más pronunciado cuando se expresa la proteína control que cuando se expresa la proteína mutante (Apartado 1.2, Resultados). Por ello inicialmente expresamos la proteína mutante con el promotor GAL4⁵⁴. Sin embargo, este promotor no es lo suficientemente fuerte para inducir la aparición de fenotipos en presencia de la clatrina control endógena (datos no mostrados). Para solventar esta situación experimental utilizamos dos promotores ubicuos, hs-GAL4 y tubP-GAL4, el primero a 28° C, y el segundo a 18° C, dado que a temperaturas superiores su expresión de clatrina induce letalidad. En estas condiciones, la expresión de clatrina control en animales control permitió la obtención de retinas donde las IOPCs están presentes y no se observan huecos entre los omatidios ni vacuolizaciones en las células pigmentarias (Fig. 12E y G). La expresión de proteína mutante *CHC^{A1082T}* en animales control con ambos promotores, indujo la aparición de espacios huecos entre los omatidios (Fig. R.12F y H, flechas), y en el caso del tubP-GAL4, IOPCs fuertemente vacuolizadas (Fig. R.12H, puntas de flecha), un indicio claro de muerte celular en las IOPCs. Estos resultados indicarían que el efecto provocado por la sobreexpresión de la proteína mutante, dependería del activador GAL4 empleado, sugiriendo la importancia de alcanzar unos niveles elevados de la proteína mutante, respecto a la endógena control para poder inducir un fenotipo similar a *Chc⁴*.

Con respecto a las neuronas, la sobreexpresión de clatrina control resultó ser bastante perjudicial, incluso en ausencia de estímulo luminoso. En el caso del promotor tubP-GAL4, que esencialmente es letal y solo permite el análisis del ocasional superviviente, podemos observar que en varios de los omatidios faltan uno o incluso dos rabdómeros (Fig. R.12G, asteriscos), y los demás están muy reducidos (Fig. R.12G). Resulta interesante que la sobreexpresión de la forma mutante en animales control provoque el efecto contrario, no afectando a la morfología de las neuronas, al tiempo que resulta muy deletérea para las IOPCs (Fig. R.12H). Este resultado es congruente con la actuación de la forma mutante como semi-dominante, induciendo con su expresión sobre fondo control un fenotipo similar al del mutante *Chc⁴*, al tiempo que su carácter hipomórfico le impide ser

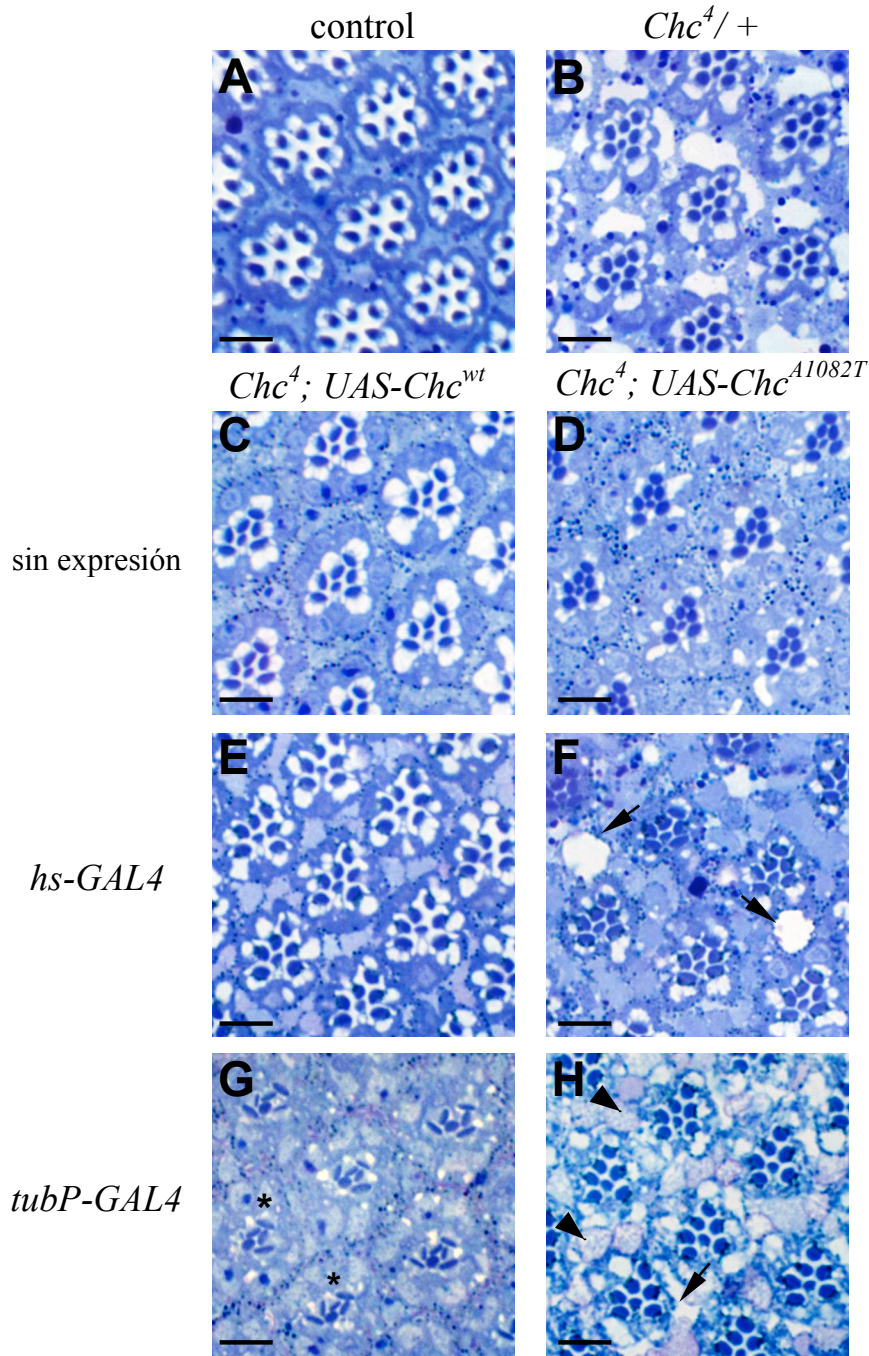


Figura R.12. Inducción del fenotipo mutante por dominancia, al expresar la clatrina mutante Chc^{A1082T} en animales control. Secciones semifinas de retinas de animales de 3 días de edad. **A.** Control (y, w). **B.** Mutante en heterocigosis ($y, w, Chc^4/y, w$), que presenta fenotipo de muerte de IOPCs debido al carácter semi-dominante de la mutación. **C y D.** Líneas transgénicas parentales empleadas en el estudio ($y, w; UAS-Chc^{wt}$) y ($y, w, UAS-Chc^{A1082T}$), sin expresión de clatrina transgénica. **E.** La expresión de la forma control Chc^{wt} , inducida con el promotor $hs-GAL4$ a $28^\circ C$ en moscas controles, no indujo la muerte de las células pigmentarias. **F.** La expresión de forma mutante Chc^{A1082T} , en las mismas condiciones indujo un ligero fenotipo retiniano, indicado por la presencia de huecos en la retina en las posiciones que ocupan las células pigmentarias. **G.** La sobreexpresión de la proteína control en moscas controles con el activador $tubP-GAL4$ a $18^\circ C$ no afecta a las IOPCs, pero las neuronas presentan rabdomeros reducidos, y en algunos omatidios faltan rabdomeros (asteriscos). **H.** Retina de animal control que expresa la proteína mutante en las mismas

condiciones que G. Hay huecos entre omatidios (flechas) y las IOPCs aparecen fuertemente vacuolizadas (cabezas de flechas) o en avanzado estado de muerte celular. Barra 10 μ m.

tan dañina sobre las neuronas en su sobreexpresión como la forma control (comparar rabadómeros Fig. R.12G y H).

El conjunto de todos estos resultados indicaría que la muerte de las células pigmentarias de la retina observada en *Chc^d* estaría causado por la mutación A1082T en la cadena pesada de la clatrina. Así mismo los resultados sugieren la importancia de unos niveles adecuados de CHC para la correcta determinación de las neuronas fotorreceptoras en el ojo de *D. melanogaster*.

3.2.2. La supresión de apoptosis no rescata la muerte de las células pigmentarias en el mutante en clatrina.

Dado que la muerte de los fotorreceptores inducida por el mutante *Chc^d* puede ser suprimida mediante la inhibición de los mecanismos de apoptosis, nos preguntamos si la muerte de las células pigmentarias en la retina del mutante tiene lugar por idénticos mecanismos.

La expresión de la proteína antiapoptótica viral p35 en la retina de *Drosophila* bloquea la muerte celular que ocurre de manera natural durante el desarrollo de la retina, induciendo un fenotipo de ojo rugoso debido al exceso de IOPCs (Hay et al., 1994).

A diferencia de lo que ocurre con las neuronas fotorreceptoras, la expresión de p35 en las células pigmentarias de la retina de mutantes *Chc^d*, utilizando el promotor GAL4⁵⁴, no fue capaz de rescatar el fenotipo de muerte celular que éstas presentan (Fig. R.13D). En la retina de estos animales se siguen apreciando los huecos originados por la muerte de las IOPCs y la progresiva separación de los omatidios características de la mutación *Chc^d* (comparar figuras R.13B y D). Estos resultados indican que la inhibición de la actividad de caspasas producida por la expresión de p35 no suprime la muerte de IOPCs. El mecanismo de funcionamiento de la actividad inhibitoria de caspasas de p35 actúa tras la activación de éstas, impidiendo su actividad proteolítica. Para confirmar que la muerte de IOPCs en *Chc^d* no tiene lugar por apoptosis, decidimos usar otro inhibidor con un mecanismo de actuación diferente: DIAP1 (del inglés, *Drosophila* Inhibitor of Apoptosis Proteín 1). DIAP1 es más efectivo en la inhibición de la apoptosis en *Drosophila*, porque suprime también la muerte inducida por la sobreexpresión de genes proapoptóticos (*reaper*, *hid*, y *grim*) en la retina de *Drosophila* (Hay et al., 1995), al ser capaz de prevenir, no sólo la actividad caspasa, sino también la activación de caspasas (Tittel and Steller, 2000).

La expresión de DIAP1, en moscas control con el promotor de células pigmentarias GAL4⁵⁴ produce el fenotipo ya descrito de inhibir la muerte celular programada que naturalmente tiene lugar entre las células precursoras de las pigmentarias, con lo que se incrementa el número de IOPCs (Fig.

R.14C), confiriendo al ojo un leve aspecto rugoso (Hay et al., 1995). La expresión en las mismas condiciones de DIAP1 en mutantes *Chc⁴*, en adición presenta el fenotipo de muerte de IOPCs (Fig. R.14D), y por lo tanto no suprime el fenotipo mutante (Fig. R.14B). Similar resultado se obtiene al expresar DIAP1 bajo control del activador GMR-GAL4 (glass multimer reporter, fig. R.14E y F), que dirige la expresión del factor de transcripción GAL4 en todas las células del ojo (pigmentarias y neuronas) desde el inicio del desarrollo de la retina en el tercer estadio larvario (Ellis et al., 1993, Hay et al., 1994). Estos resultados indican que los mecanismos de muerte celular de neuronas y células pigmentarias en el mutante *Chc⁴* son distintos. Junto con el resultado de que es posible prevenir la muerte de las neuronas, pero no de las células pigmentarias, mediante la ausencia de iluminación, nos planteamos la posibilidad de que se trate de fenómenos independientes no relacionados, a pesar de que ambos resulten en la muerte de una de las dos poblaciones más importantes de células de la retina.

En resumen, la mutación identificada en el alelo *Chc⁴* de la cadena pesada de la clatrina induce dos fenotipos de gran severidad en la retina de *Drosophila*. En primer lugar, en moscas recién eclosionadas se observa un proceso de muerte celular que afecta a las células pigmentarias interommatidiales. Dicho proceso, que claramente se inicia antes del término de la metamorfosis, es independiente de las condiciones de iluminación y no puede ser prevenido mediante la inhibición de la apoptosis. Por otra parte, y de forma dependiente de iluminación, existe un proceso de neurodegeneración retiniana, que puede ser prevenido mediante la inhibición de la apoptosis. La existencia de fenotipos previos a la eclosión de la forma adulta de *Drosophila* nos ha llevado a investigar si el desarrollo de la retina transcurre con normalidad entre los mutantes *Chc⁴*.

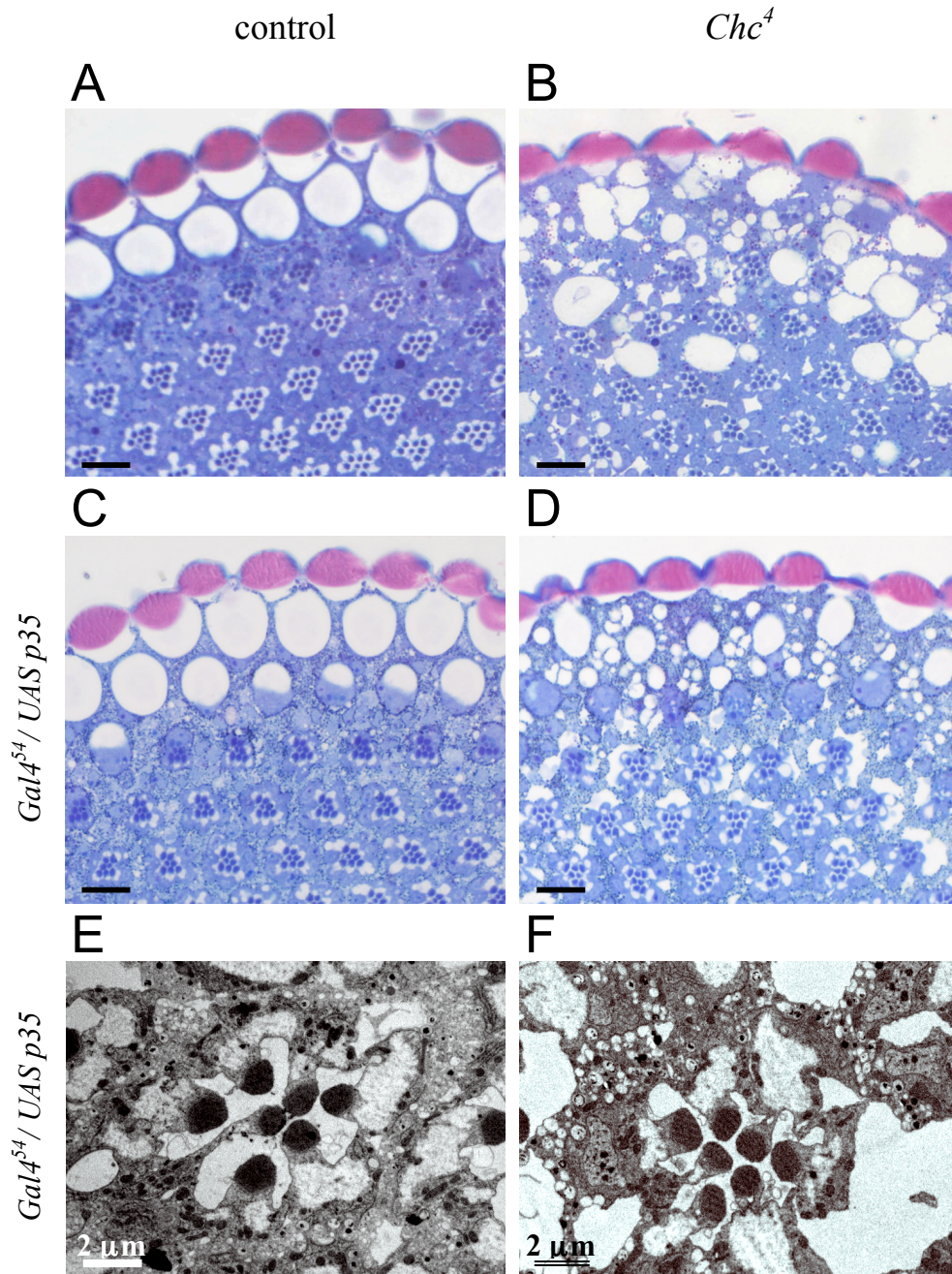


Figura R.13. La expresión de la proteína antiapoptótica p35, no previene la muerte de las células pigmentarias en el mutante *Chc⁴*. Secciones semifinas de ojos de adultos de 3 días de edad crecidos en oscuridad continua. **A.** Control (*y, w*). **B.** Mutante (*y, w, Chc⁴*). **C.** Expresión de la proteína antiapoptótica p35 en las células pigmentarias de la retina de un animal control (*y, w; GAL4⁵⁴/UAS-p35*). **D.** La expresión de p35 en mutantes *Chc⁴*, dirigida con el activador *GAL4⁵⁴* no suprime el fenotipo de muerte de las células pigmentarias de la retina (*y, w, Chc⁴; GAL4⁵⁴/UAS-p35*). Barra 20 μm. **E** y **F** secciones ultrafinas correspondientes a B y D.

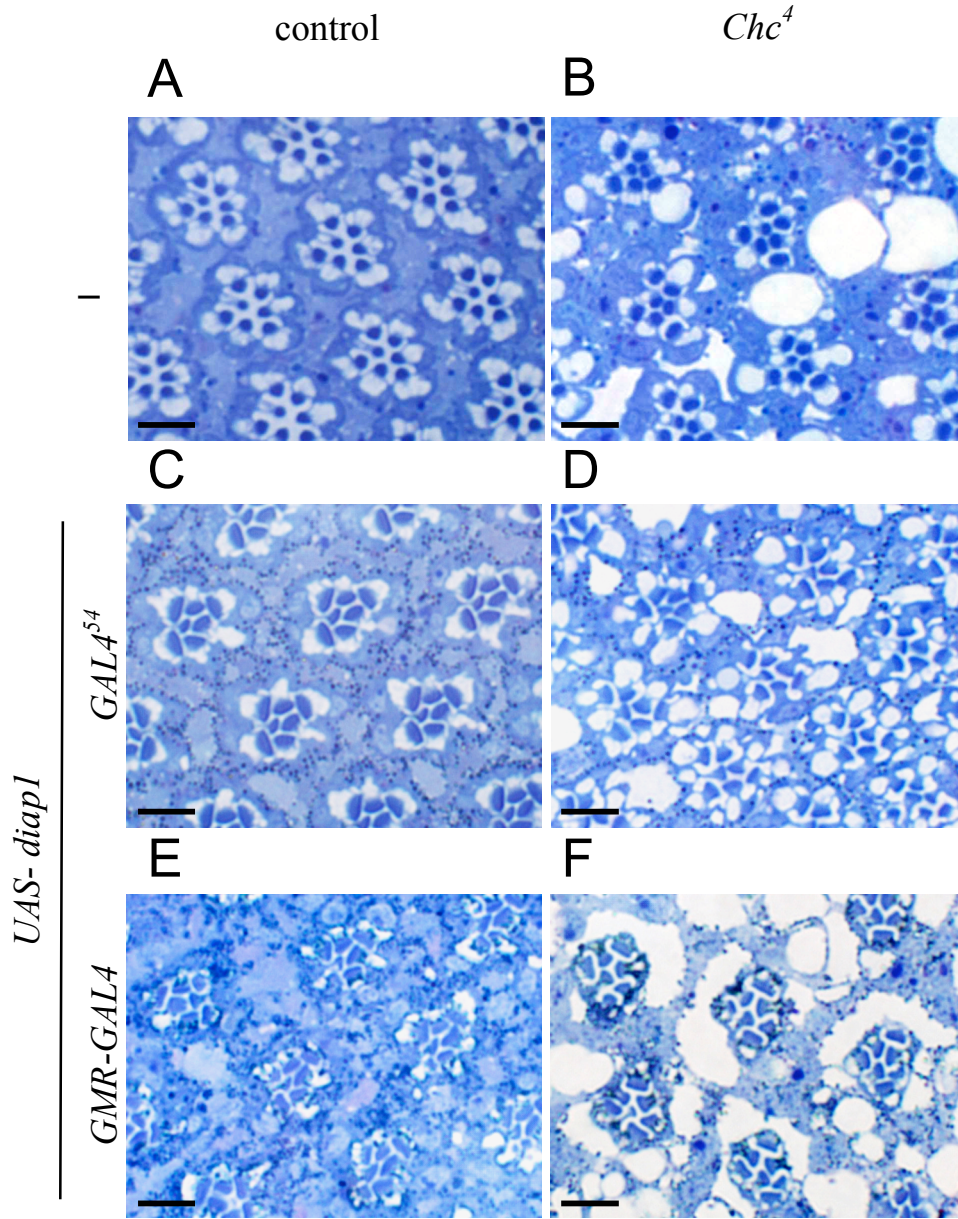


Figura R.14. La expresión de la proteína antiapoptótica DIAP1 tampoco previene la muerte de las células pigmentarias en el mutante *Chc⁴*. Secciones de ojo en las mismas condiciones que en la figura R.13. **A.** Control (*y, w*). **B.** Mutante (*y, w, Chc⁴*). **C.** Retina control que expresa la proteína DIAP1 en las células pigmentarias (*y, w; GAL4⁵⁴/ UAS-diap1*). **D.** Expresión en células pigmentarias de la proteína antiapoptótica DIAP1 en mutantes *Chc⁴* (*y, w, Chc⁴; GAL4⁵⁴/ UAS-diap1*). La inhibición de la apoptosis no previene la muerte de las células pigmentarias. **E.** La expresión de DIAP1 en todas las células de la retina de moscas control produce un exceso de IOPCs (*y, w; GMR-GAL4/ UAS-diap1*). **F.** La expresión de DIAP1 en retinas mutantes en las mismas condiciones (*y, w, Chc⁴; GMR-GAL4/ UAS-diap1*), no evita la muerte de las células pigmentarias. Barra 10 μ m.

4. El desarrollo larvario de la retina no se ve afectado en el mutante *Chc⁴*.

Durante el desarrollo larvario tardío, en la retina se van diferenciando de manera secuencial las neuronas fotorreceptoras, y justo antes del inicio de la metamorfosis se determinan también las células del cono (Voas and Rebay, 2004). Las células pigmentarias se determinan más tarde, en la retina pupal durante la metamorfosis (Demerec, 1994, Cagan and Ready, 1989b).

Al analizar los discos imaginales de ojo-antena de animales control, teñidos con sulfito de cobalto (Apartado 5, Métodos), se observa la posición de la oleada de diferenciación denominada surco morfogenético (MF, fig. R.15A). Esta oleada de diferenciación atraviesa el disco imaginal durante el tercer estadio larvario desde el extremo posterior hasta el anterior, reclutando a las neuronas fotorreceptoras, que aparecen marcadas más intensamente formando grupos celulares que están ordenados espacialmente, en filas y columnas, siguiendo tres ejes de simetría (Fig. R.15B).

Cuando analizamos los discos de ojo-antena procedentes de machos mutantes *Chc⁴*, mediante esta tinción no observamos diferencias en el patrón espacial del reclutamiento de las células fotorreceptoras (Fig. R.15C y D).

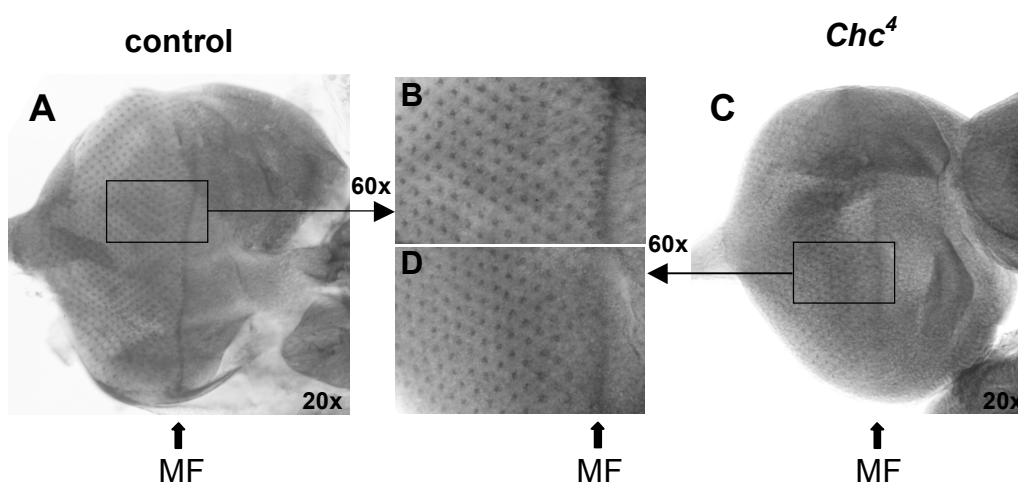


Figura R.15. Tinción de sulfito de cobalto en los discos imaginales de ojo-antena de *D. melanogaster*. A. Disco control (genotipo *cho²*) B. Detalle de la retina donde se observa el surco morfogenético MF a la derecha, y las neuronas ya determinadas teñidas con el sulfito de cobalto. C. y D. Disco mutante (genotipo *cho², Chc⁴*) y detalle de la retina. No se observaron diferencias en el marcaje entre discos controles y mutantes. Anterior es a la derecha.

Adicionalmente hemos analizado la morfología y posición de las neuronas fotorreceptoras durante el desarrollo pupal, expresando GFP en las neuronas postmitóticas con el promotor *elav-GAL4* (datos no mostrados; Lee and Luo, 1999). Estos estudios, y la eclosión de los adultos *Chc⁴* con una dotación completa y una distribución y morfología correcta de las ocho neuronas presentes

en cada omatidio (Fig. R.10F), indican que no existen defectos obvios en la determinación y formación de las neuronas fotorreceptoras en el mutante.

Así mismo, las células del cono no presentan ningún defecto visible en su determinación, como se muestra en la siguiente sección (Fig. R.17D y E). De hecho las células del cono se ocupan de la secreción de la lente durante el desarrollo pupal, y los omatidios de los mutantes *Chc⁴* presentan todos lentes adecuadamente secretadas.

5. *Chc⁴* inhibe la muerte celular programada de los precursores de las células pigmentarias interomatidiales.

Los resultados obtenidos hasta el momento, indican que las etapas iniciales del desarrollo de la retina durante el estadio larvario en el mutante *Chc⁴*, transcurre de un modo similar que en moscas controles. Para analizar la especificación de los demás tipos celulares en el mutante hemos analizado el desarrollo de la retina durante el estadio pupal. Durante la metamorfosis se determinan las células pigmentarias primarias (PPCs), aproximadamente al 12% del desarrollo pupal, y las últimas células en determinarse son las células pigmentarias interomatidiales (IOPCs, fig. M.2, Métodos; Cagan and Ready, 1989a).

Las IOPCs proceden de un conjunto de células indiferenciadas, que se encuentran en exceso en número, y que sufren un proceso de muerte celular programada ó PCD durante la metamorfosis (entre 25 y 35% del desarrollo pupal (Wolff and Ready, 1993; Rusconi et al., 2000), donde se eliminan aproximadamente un tercio de las células que se encuentran entre los omatidios. Tras la PCD, en torno al 40% del desarrollo, las retinas controles presentan ya el número correcto de IOPCs (Fig. I.7, Introducción).

La presencia en el mutante *Chc⁴* de una mortandad excesiva y tardía de IOPCs podría sugerir una desregulación del proceso normal de PCD que provocara que éste tuviera lugar con retraso y de forma aumentada. Esta posibilidad se vería apoyada por el retraso en el desarrollo que provoca la mutación *Chc⁴*. Para analizar esta posibilidad hemos estudiado el proceso de PCD en la retina de los mutantes *Chc⁴*, utilizando el marcador de muerte celular Naranja de Acridina (Apartado 3.3, Métodos), que tiñe las células muertas y sus restos celulares cuyas membranas se han permeabilizado (Spreij, 1971).

Las retinas control, mostraron un marcaje máximo con Naranja de Acridina en torno a las 30 horas tras la formación del pupario ó APF a 25° C (Fig. R.16B). Este tiempo corresponde al 28 % del desarrollo pupal. Estos datos corresponden con lo descrito en la literatura, donde el pico de muerte celular tiene lugar a las 25 horas, lo que se refleja en un máximo de marcaje unas horas más

tarde, cuando las células muertas se hacen detectables por este método (Reiter et al., 1996). Unas diez horas más tarde, los restos celulares han sido fagocitados, y desaparece la tinción (Fig. R.16E), comenzando un proceso más tardío de muerte celular que afecta únicamente a los omatidios situados en el borde del ojo (Fig. R.16F; Wolff and Ready, 1991).

Las retinas mutantes *Chc⁴* mostraron un marcaje similar al de retinas controles, sin embargo el pico máximo de tinción con Naranja de Acridina presentaba un leve retraso, teniendo lugar en torno a las 33 h APF (Fig. R.16I), es decir aproximadamente 3 horas más tarde con respecto a los individuos controles. Sin embargo, cuando se expresa en porcentajes del tiempo total de desarrollo pupal, tanto en controles como en mutantes, el pico máximo de tinción con Naranja de Acridina tiene lugar aproximadamente al 28% del total del tiempo de desarrollo en ambos casos. Este resultado, junto con la evidencia de que la intensidad de tinción no está aumentada en la retina mutante, y de que la tinción en ambos casos desaparece en torno al 40% del desarrollo pupal, indican que la PCD que elimina a los precursores sobrantes de las IOPCs no está incrementada en la retina mutante.

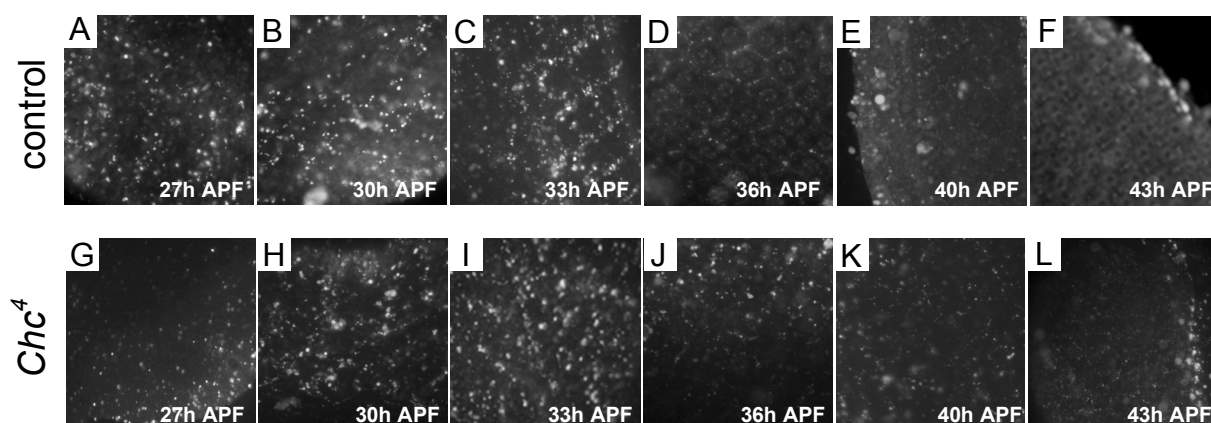


Figura R.16. La muerte celular programada no está incrementada en el mutante *Chc⁴*. Tinción con Naranja de Acridina de retinas pupales a diferentes tiempos del desarrollo pupal a 25° C. **A-F.** La tinción máxima en retinas controles (*Oregon R*) se observó a las 30 horas APF (tras la formación del pupario) y prácticamente ha desaparecido a las 40 horas APF. **G-L.** En las retinas procedentes de mutantes (*cho²*, *Chc⁴*), la tinción máxima se observó a las 33 horas APF, habiendo desaparecido a las 43 horas APF, con excepción de la oleada de muerte periférica tardía.

La organización de la retina pupal de *Drosophila*, también se puede estudiar utilizando un anticuerpo monoclonal contra armadillo (β -catenina de *Drosophila*), que permite visualizar las membranas de los diferentes tipos celulares que componen un omatidio (Apartado 3.2, Métodos). Esta técnica permite estudiar la retina hasta aproximadamente el 55% del desarrollo pupal, cuando la secreción de lentes y pigmentos impide el uso de técnicas fluorescentes en el ojo de *Drosophila*.

En la posición central de cada omatidio, se observan las cuatro células del cono (CCs), en torno a las cuales aparecen dos células pigmentarias primarias (PPCs) que se sitúan apicalmente sobre los fotorreceptores (Fig. R.17A y B). En torno a ellas se sitúan las IOPCs y los mecanorreceptores. En torno a cada omatidio se observan formando un hexágono doce células: tres mecanorreceptores, seis IOPCs compartidas entre dos omatidios y tres IOPCs compartidas por tres omatidios. En una retina control, por cada omatidio, hay por tanto 4 IOPCs de media ($6/2 + 3/3$). Con posterioridad al 40% del desarrollo pupal, los cambios morfológicos que se suceden en la retina de *Drosophila* se deben a la maduración de cada tipo celular. Las IOPCs, se estrechan (Fig. R.17C) y comienza la síntesis de pigmentos, la retina se compacta, los fotorreceptores secretan el líquido intraomatideo y forman el rabdómero y las células del cono y PPCs secretan la córnea y el pseudocono.

Como ya habíamos señalado (Apartado 4, Resultados), en las retinas de mutantes *Chc⁴* se aprecian cuatro CCs y dos PPCs por omatidio, al igual que en retinas controles (Fig. R.17D y E). Indicando por tanto que en el mutante *Chc⁴*, su especificación sucede sin incidencias.

Sorprendentemente, las retinas mutantes *Chc⁴* obtenidas de pupas mantenidas a 25° C de temperatura mostraron al 40% del desarrollo pupal, un exceso en el número de IOPCs que se encuentran entre los omatidios (Fig. R.17E, asteriscos). Es frecuente observar omatidios en contacto con 10 e incluso con 11 IOPCs en lugar de las 9 habituales. Así mismo, el mutante *Chc⁴* presenta errores en la localización de las quetas mecanosensoriales en mayor frecuencia comparado con retinas controles (Fig. R.17E, flechas).

Puesto que el número de células precursoras de pigmentarias por omatidio es el mismo en retinas control y retinas mutantes, cabe concluir que la PCD en el mutante *Chc⁴* no es capaz de eliminar a todas las células precursoras sobrantes.

Resulta interesante destacar que el fenotipo de inhibición de la PCD que muestra el mutante *Chc⁴*, presenta al igual que otros fenotipos de este alelo, una dependencia de temperatura. El análisis de la retina de animales mutantes que han sido crecidos a 18° C desde la etapa embrionaria, muestra que éste fenotipo es mucho más leve bajo estas condiciones (Fig. R.17D, asterisco). A la temperatura de 18° C, donde las alteraciones en el número de IOPCs son menores, los errores en la localización de las quetas son también menores (Fig. R.17D, flecha). Sin embargo, el número de quetas mecanosensoriales de la retina no se ve afectado por la mutación, por lo que cabe pensar que es la alteración en el número de IOPCs la responsable de la localización errónea de éstos. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que otros mutantes que presentan un número incrementado de IOPCs, como *roughest* y *echinoid*, presentan también errores en la localización de las quetas mecanosensoriales (Wolff and Ready, 1991).

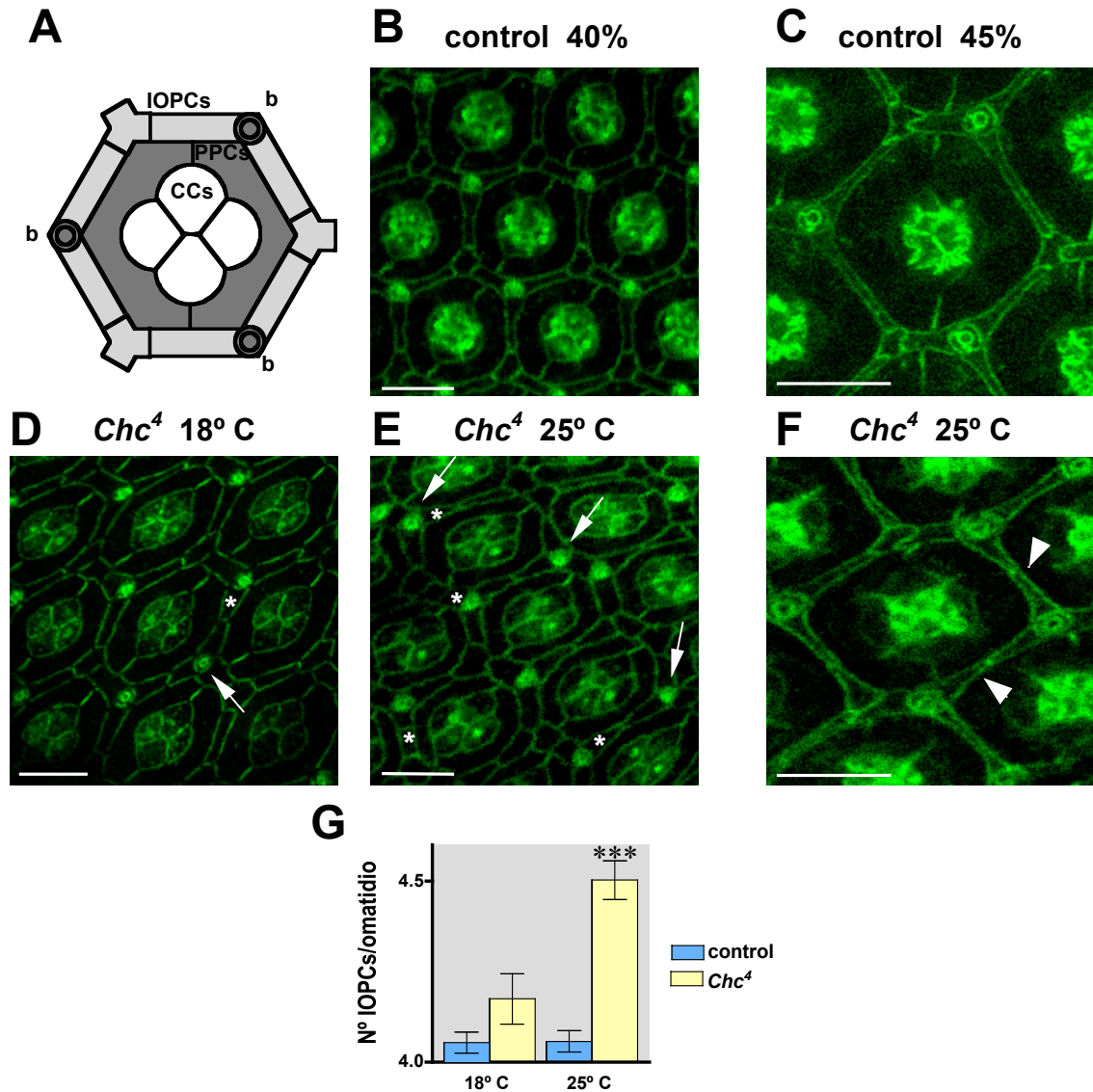


Figura R.17. La mutación *Chc⁴* inhibe la muerte celular programada de las células interommatidiales. **A.** Esquema de una sección apical de un omatidio. CCs (células del cono), y PPCs (células pigmentarias primarias), se encuentran en el mismo eje pero en posición apical a las neuronas fotorreceptoras que no se aprecian en este plano. Rodeando el omatidio se localizan las células pigmentarias interommatidiales (IOPCs) y las 3 quetas mecanosensoriales (b, bristle). **B-F.** Secciones de confocal apicales de retinas pupales teñidas con el anticuerpo anti-armadillo indicando su porcentaje de desarrollo pupal. **B.** Control (*Oregon R*) del 40%. **C.** Control del 45% donde se observa el estrechamiento de las IOPCs que sucede en la maduración de la retina. **D.** Mutante del 40% (*cho², Chc⁴*) crecido a 18° C, donde se observa un ligero exceso de IOPCs (asterisco, célula sobrante), y algún error de localización del mecanorreceptor (flecha). **E.** Mutante del 40% (*cho², Chc⁴*) crecido a 25° C, en el que se observa un número mayor de células en exceso (asteriscos). Estas alteraciones ocasionan frecuentes errores en la localización de los mecanorreceptores (flechas). **F.** El exceso de IOPCs está presente en retinas mutantes *Chc⁴* maduras, (45% de desarrollo pupal, puntas de flechas). **G.** Media \pm SEM del número de IOPCs sobrantes por omatidio. El exceso de IOPCs que presentan los mutantes a 25° C es significativo para una $P < 0,005$ (***) respecto al número de IOPCs en moscas controles. Análisis estadístico mediante el test *t-Student*. Barra 10 μ m.

El exceso de IOPCs en los mutantes *Chc⁴*, se debe a defectos específicos en la PCD, y no a su retraso, puesto que dicho exceso se mantiene una vez que ha terminado la PCD y comienza la maduración de las IOPCs (Fig. R.17F, cabezas de flecha).

Para cuantificar el exceso de IOPCs debido a la inhibición de la PCD en el mutante *Chc⁴*, hemos determinado el número de células pigmentarias sobrantes por omatidio (Apartado 3.4, Métodos). Las retinas control presentan aproximadamente una IOPC sobrante cada veinte omatidios, tanto a 18° C como a 25° C (*Oregon R* a 18° C: $0,05 \pm 0,03$; n=27. A 25° C: $0,06 \pm 0,03$; n=34. Fig. R.17G). Mientras que las retinas mutantes presentan a 18° C una IOPC extra cada cinco omatidios ($0,18 \pm 0,07$; n=31. Fig. R.17G) y a 25° C la mitad de los omatidios mutantes presenta una IOPC extra ($0,50 \pm 0,05$; n=83. Fig. R.17G).

5.1. La inhibición de la muerte celular programada de precursores de células pigmentarias provoca cambios en la superficie ocular.

La morfología externa de las facetas o unidades del ojo de *Drosophila* es consecuencia de la secreción de las lentes y el pseudocono por parte de las células pigmentarias primarias y las células del cono de cada omatidio (Cagan and Ready, 1989a). Este proceso se inicia en torno al 43% del desarrollo de la retina pupal, cuando ya se han especificado todos los tipos celulares que componen la retina. De este modo en el individuo adulto la superficie de las facetas se disponen ordenadas en filas y columnas formando una red hexagonal, donde a su vez cada faceta tiene una forma hexagonal también (Fig. R.18A). La regularidad de este patrón depende críticamente de que no se altere el número de células por omatidio, o en caso contrario se produce un ojo de aspecto externo rugoso (Markopoulou et al., 1989, Hay et al., 1994, Tanenbaum et al., 2000, Rusconi et al., 2004).

Con el objetivo de determinar en qué medida los defectos detectados en la retina pupal del mutante *Chc⁴*, podrían alterar el aspecto del ojo en el individuo adulto, nos planteamos estudiar su morfología externa. Puesto que mediante la observación directa a la lupa, los ojos de machos adultos *Chc⁴* eran aparentemente normales, realizamos un análisis mediante microscopía de barrido que permite observar en mayor detalle su morfología externa.

El análisis mediante dicha técnica de los ojos procedentes de machos *Chc⁴* a bajos aumentos mostraba un ligera desorganización de la retina en los mutantes crecidos a 25° C de temperatura, mientras que a 18° C, el ojo no es distinguible de un ojo control (Fig. R.18A-C). A 1000 aumentos es posible apreciar la regularidad externa del ojo compuesto de *Drosophila*, con las quetas mecanosensoriales regularmente intercaladas entre las lentes de base hexagonal y desarrollo esferoidal (Fig. R.18D). A 18° C, el análisis detallado de la superficie ocular muestra una ligerísima alteración de la simetría hexagonal, acompañada de una más obvia alteración en la posición de algunas quetas mecanosensoriales (Fig. R.18E, flechas).

Sin embargo el mutante *Chc⁴* crecido a 25° C reflejaban múltiples alteraciones en el alineamiento de las facetas en comparación con moscas controles y con el propio mutante crecido a 18° C (Fig. R.18F). De hecho, algunas facetas muestran un perímetro pentagonal en lugar de hexagonal. Este fenotipo, al igual que muchos de los fenotipos de *Chc⁴*, presenta penetrancia variable y en la imagen se muestra uno intermedio. Teniendo en cuenta los resultados anteriores estos defectos podrían tener su base en el exceso de IOPCs detectado en el análisis de la retina pupal del mutante (Apartado 3.4, Resultados), puesto que la secreción de la quitina entre las lentes corre a cargo de las IOPCs (Wolff and Ready, 1993). De este modo, en el proceso de maduración y compactación que sufre la retina al final del desarrollo pupal, habría vértices que estarían ocupados por más de una célula pigmentaria interomatifidial en las retinas *Chc⁴*, provocando un aspecto diferente de las facetas al no estar espaciadas por el mismo número de células. Además, los mutantes crecidos a 25° C presentan una desorganización muy evidente en la posición que ocupan las quetas mecanosensoriales (Fig. R.18F), estando presentes en vértices contiguos de las facetas.

En resumen, las retinas mutantes *Chc⁴* presentan tras la muerte celular programada un número de células pigmentarias interomatifidiales mayor que las retinas controles. Este hecho sugiere un defecto específico en la PCD, puesto que la determinación de los fotorreceptores, de las células del cono y de las células pigmentarias primarias en el mutante *Chc⁴* sucede correctamente. La inhibición de la PCD tardía que se observa en *Chc⁴* sería parcial, puesto que el exceso de IOPCs que presenta el mutante a 25° C, es de una media de una célula por cada dos omatidios (Tabla Fig. R.17 G), mientras que en mutantes donde la PCD es inhibida por completo el número de IOPCs extra por omatidio es superior (Wolff and Ready, 1991). Por tanto estos resultados indicarían que durante el desarrollo de la retina pupal en el mutante hipomórfico de la cadena pesada de la clatrina *Chc⁴*, está alterado el mecanismo por el cual se seleccionan las células apoptóticas entre las células precursoras interomatifidiales. Esta alteración sería dependiente de la temperatura. Las retinas mutantes presentan además alteraciones en el patrón específico de los pelos mecanosensoriales posiblemente como consecuencia del exceso de IOPCs.

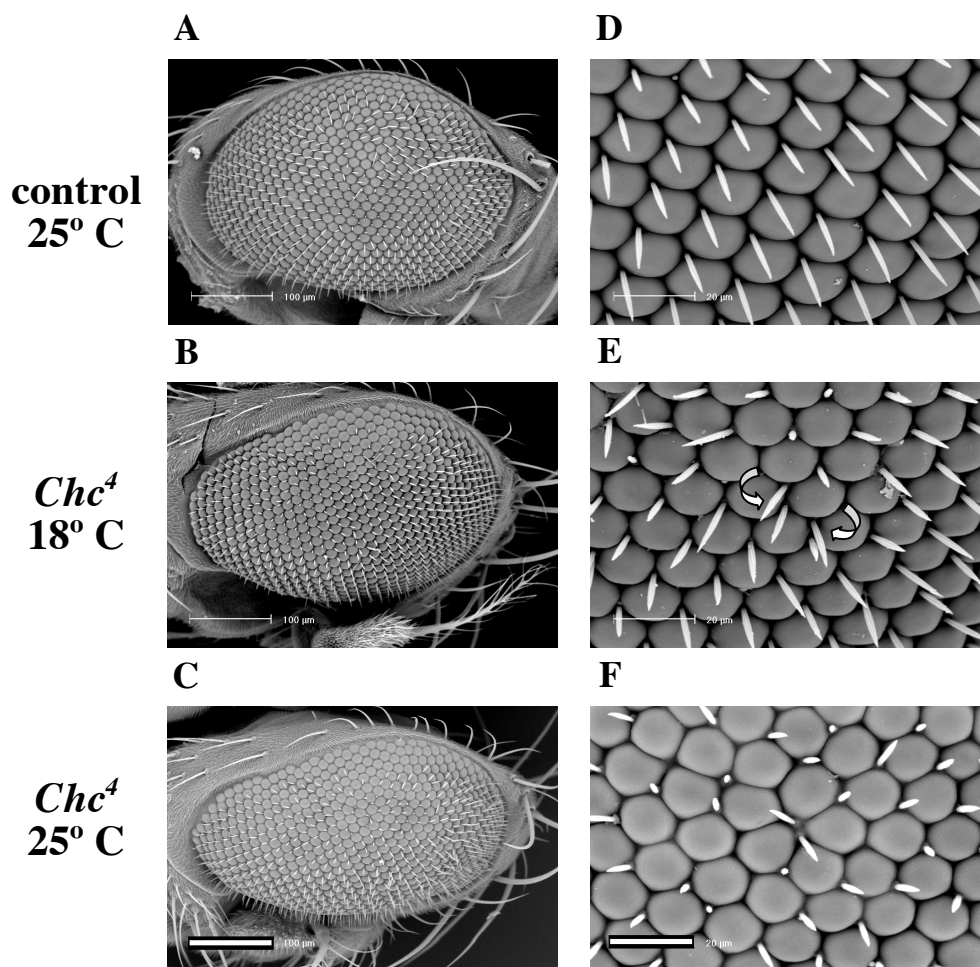


Figura R.18. Las alteraciones en el número de células interomatidiales altera la morfología externa del ojo adulto de *D. melanogaster*. Microscopía electrónica de barrido de ojos adultos **A** y **D**. Control (*y, w*). Obsérvese la regularidad en el orden de las lentes y de las quetas mecanosensoriales. **B** y **E**. El mutante (*y, w, Chc⁴*) crecido a 18° C, presenta una morfología externa normal en apariencia, sin embargo a mayores aumentos se aprecian errores en la localización de las quetas (flechas). **C** y **F**. El mutante (*y, w, Chc⁴*) crecido a 25° C presenta un fenotipo de penetrancia variable, donde se observan alteraciones en la simetría hexagonal de los omatidios y múltiples errores en el patrón de las quetas. Barra, 100 μm en A, B y C; y 20 μm en D, E y F.

6. El fenotipo retiniano de *Chc⁴* está determinado por la actividad del receptor Notch.

Resulta aparentemente contradictorio que el mismo defecto, una mutación puntual en la cadena pesada de la clatrina, provoque en las células pigmentarias de la retina consecutivamente durante el desarrollo pupal una supervivencia excesiva a la muerte celular programada seguida de una mortandad absoluta de dicha población, que se completa tras la eclosión del adulto. Es razonable pensar que ambos fenómenos puedan estar relacionados, y por ello hemos tratado de analizar si existen factores comunes a ambos.

De la PCD que sufren los precursores de IOPCs se sabe relativamente poco, a pesar de haberse descubierto hace ya 18 años (Cagan and Ready, 1989a), mientras que los periodos posteriores del desarrollo de la retina son aún menos conocidos. Sin embargo se sabe que la PCD retiniana requiere de la señalización mediada por el receptor Notch, en cuya ausencia no tiene lugar (Cagan and Ready, 1989b, Miller and Cagan, 1998, Cordero et al., 2004). Por el contrario, la señalización a través del EGFR induce la supervivencia de las IOPCs (Freeman, 1996, Yu et al., 2002).

Aunque no se sabe si Notch continúa teniendo un papel tras la PCD en el desarrollo tardío del ojo de *Drosophila*, si se sabe que el EGFR deja de estar presente en la retina pupal tras la PCD (Freeman and Bienz, 2001). Adicionalmente, en *Drosophila* se sabe que alteraciones en la endocitosis provocan disfunciones en la señalización mediada por Notch (Seugnet et al., 1997, Parks et al., 2000, Weber et al., 2003).

Por todo ello nos hemos preguntado si los defectos en la endocitosis provocados por la mutación *Chc⁴* pueden causar algunos de los fenotipos retinianos a través de alteraciones en la vía de señalización del receptor Notch.

6.1. Interacción génica entre mutantes de *Notch* y *Chc⁴*.

Con el objetivo de estudiar las posibles interacciones entre el mutante *Chc⁴*, y la vía de señalización mediada por Notch en la retina de *Drosophila*, analizamos si mutaciones en el gen *Notch* (*N*), modifican el fenotipo de muerte de las IOPCs observado en *Chc⁴*. Puesto que alelos fuertes de *N* resultan letales, y dado que se requiere para la determinación de todos los tipos celulares de la retina (Cagan and Ready, 1989b, Artavanis-Tsakonas et al., 1999, Voas and Rebay, 2004), hemos empleado el alelo temperatura sensible *N^{ts1}*, descrito como hipomorfo a la temperatura de 31° C (Shellenbarger and Mohler, 1975), y la mutación recesiva del grupo de mutantes facet, *N^{fa-g62}* (también conocida como *N^{fa-g2}*) que afecta al desarrollo de la retina pupal de *Drosophila*, presentando un patrón irregular de las facetas en el individuo adulto, debido al exceso de IOPCs (Shellenbarger and Mohler, 1975, Markopoulou et al., 1989, Miller and Cagan, 1998).

N^{fa-g62}, pertenece a un grupo de alelos de *N* con fenotipo específico en el ojo, donde está alterado el desarrollo de las células pigmentarias de la retina. Las retinas *N^{fa-g62}* presentan un número reducido de células pigmentarias primarias y un exceso de IOPCs debido a una inhibición de la PCD, dando lugar a un ojo de aspecto rugoso (Miller and Cagan, 1998). Este fenotipo puede observarse ligeramente en las secciones semifinas, donde el espacio entre los omatidios está ligeramente incrementado si se compara con la distancia existente entre omatidios contiguos en la línea control *Oregon R* (Fig. R.19A y B). El análisis de la retina del doble mutante *N^{fa-g62}, Chc⁴*

reveló que la falta de función de *N* suprimía el fenotipo de muerte de las IOPCs provocado por la mutación en clatrina. A diferencia del mutante *Chc⁴*, que presenta el fenotipo de muerte de IOPCs con aparición de espacios sin células entre los omatidios (Fig. R.19C, flechas), el doble mutante *N^{fa-g62}, Chc⁴* es esencialmente indistinguible del mutante *N^{fa-g62}*, presentando un exceso de IOPCs sin aparición de fenotipos asociados a la muerte celular (Fig. R.19D).

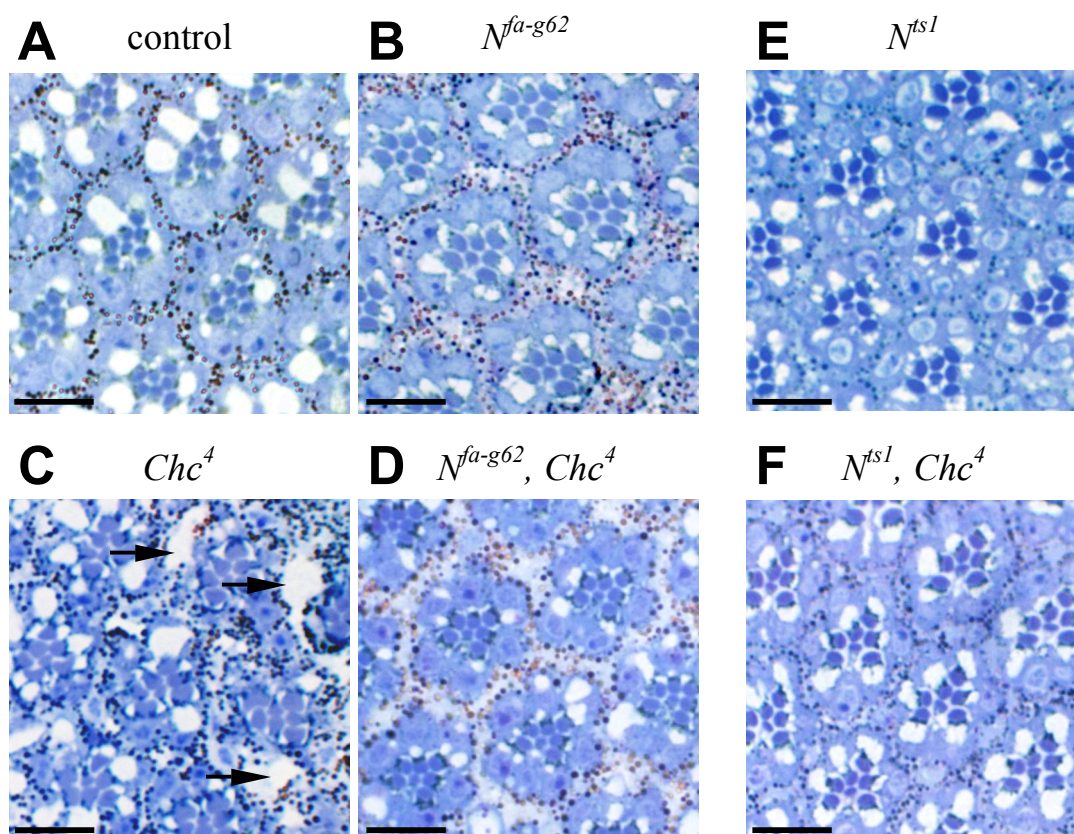


Figura R19. La muerte de las células pigmentarias interommatidiales en el mutante *Chc⁴* es inhibida por la falta de función de Notch. A-D Secciones semifinas de ojo de moscas de 3 días crecidas en oscuridad. E y F. Secciones de moscas de 3 días crecidas en oscuridad a 18° C, con un choque térmico de 6 h a 31° C al 35 % del desarrollo pupal. A. Control (*Oregon R*). B. Alelo mutante *N^{fa-g62}*, que presenta inhibición de la PCD y exceso de IOPCs. C. Mutante *Chc⁴*. Se observa la aparición de espacios entre omatidios debido a la muerte de IOPCs (flechas). D. Doble mutante en clatrina y Notch (*N^{fa-g62}, Chc⁴*), donde se observa una supresión de la muerte de IOPCs. E. Mutante *N^{ts1}*, que presenta una retina normal. F. En el doble mutante *N^{ts1}, Chc⁴*, se observa también una supresión de la muerte de IOPCs de *Chc⁴*, rescatándose el fenotipo del mutante. Barra 20 μm.

Este sorprendente resultado fue confirmado con el análisis de la interacción génica entre *Chc⁴* y el alelo sensible a temperatura *N^{ts1}*. Tanto el mutante *N^{ts1}*, como el doble mutante *N^{ts1}, Chc⁴* fueron crecidos a 18° C en oscuridad, condiciones en las que el alelo ts de *Notch* no presenta

fenotipo. Cuando las pupas alcanzan un 35% de su desarrollo, tras la PCD, se les dio un choque térmico a 31° C durante 6 horas, retornándose a la temperatura permisiva hasta la disección, 3 días tras su eclosión. La retina del mutante *N^{ts1}* no presenta fenotipo alguno bajo estas condiciones, dado que la actividad de Notch no está alterada durante la PCD y la especificación de las IOPCs (Fig. R.19E). Sin embargo la falta de Notch a partir del 35% del desarrollo pupal en el doble mutante debido al choque térmico previene completamente la muerte de las IOPCs que causa la mutación *Chc⁴* (Fig. R.19F). Cuando los choques térmicos se realizaban en el doble mutante *N^{ts1},Chc⁴* antes de la PCD, se suprimía también ésta, provocando la supervivencia de un exceso de IOPCs como en el caso de *N^{fa-g62}*.

La interacción génica entre los mutantes de Notch y de clatrina, unido al conocimiento que tenemos de la importancia de la endocitosis mediada por clatrina en la función de Notch (Poodry et al., 1973, Seugnet et al., 1997, Weber et al., 2003, Schweisguth, 2004, Le Borgne, 2006), abren la posibilidad de que los fenotipos observados en la retina del mutante se deban a alteraciones en la función del receptor Notch causadas por un defecto en el tráfico vesicular del mismo. En cualquier caso los resultados demuestran que el defecto en la cadena pesada de la clatrina requiere en la retina de la función de *N* para manifestarse.

6.2. Cambios en la localización subcelular del receptor Notch en las células pigmentarias del mutante *Chc⁴*.

Una posible explicación para la interacción observada entre los mutantes de *Notch* y *Chc*, es que exista una alteración en la endocitosis mediada por clatrina del receptor, alterando su capacidad para señalizar. Esta explicación sería compatible con estudios previos que indican que el receptor Notch se expresa fuertemente en las IOPCs y en niveles muy bajos ó ausente en las PPCs y CCs (Fehon et al., 1991, Reiter et al., 1996), dado que explicaría por qué las IOPCs son la subpoblación retiniana más afectada. Para explorar esta posibilidad, hemos estudiado la localización subcelular del receptor Notch en retinas del 40% del desarrollo pupal, una vez terminada la PCD, y antes de que se manifieste el fenotipo de muerte celular de IOPCs. Para ello hemos utilizado un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la región intracelular del receptor Notch de *Drosophila* (NICD, Apartado 5.1, Materiales y 3.2, Métodos). Si los defectos en la endocitosis de *Chc⁴*, afectaran al receptor Notch esperaríamos encontrar diferencias en la localización celular del receptor en las IOPCs de retinas *Chc⁴* respecto a retinas controles.

Las tinciones realizadas en retinas control muestran un fuerte marcaje de Notch en las IOPCs, y un marcaje más débil en PPCs y CCs (Fig. R.20A y C). Las secciones apicales, donde

tiene lugar la señalización (Fehon et al., 1991), muestran una localización difusa del receptor, principalmente en el interior de las IOPCs, pero también en los contactos entre las IOPCs y PPCs, y en mucha menor medida entre CCs y PPCs (Fig. R.20A). En secciones basales, donde no se lleva a cabo señalización, se aprecia una localización más intracelular y vesicular de Notch (Fig. R.20C).

En retinas mutantes del mismo nivel de desarrollo, observamos un cambio en la localización de Notch. A diferencia de las retinas control, el receptor se localiza principalmente en los contactos celulares entre las IOPCs y PPCs (Fig. R.20B, flechas), en vez de en el interior de las IOPCs. Además los mutantes presentan un prominente marcaje de los contactos apicales entre PPCs y CCs (Fig. R.20B, cabezas de flechas). En resumen, observamos en la retina del mutante *Chc⁴* un cambio en la localización del receptor, que se asocia en mayor medida con la membrana. Dicho cambio es específico de las secciones apicales donde tiene lugar la señalización, dado que las secciones basales de la retina mutante no son significativamente diferentes de las secciones basales del control (Fig. R.20D).

El prominente marcaje de Notch en la membrana apical de las IOPCs del mutante *Chc⁴*, unido al hecho de que dicho mutante presenta un claro defecto en endocitosis (Apartado 2, Resultados), nos lleva a considerar la posibilidad de que la muerte de células pigmentarias en el mutante se deba a un exceso de Notch en la membrana, lo que podría conducir a un exceso de señalización del receptor, en un momento en que debería estar reduciéndose su presencia en la membrana (Reiter et al., 1996).

Esta hipótesis sugiere que la presencia de Notch en los contactos entre IOPCs y PPCs se atenúa tras la PCD, mediante endocitosis mediada por vesículas de clatrina, y que el fallo en hacerlo de forma eficiente acarrea la muerte de las células por exceso de señalización de Notch, a quien se ha señalado como inductor de la muerte celular durante la PCD (Rusconi et al., 2000).

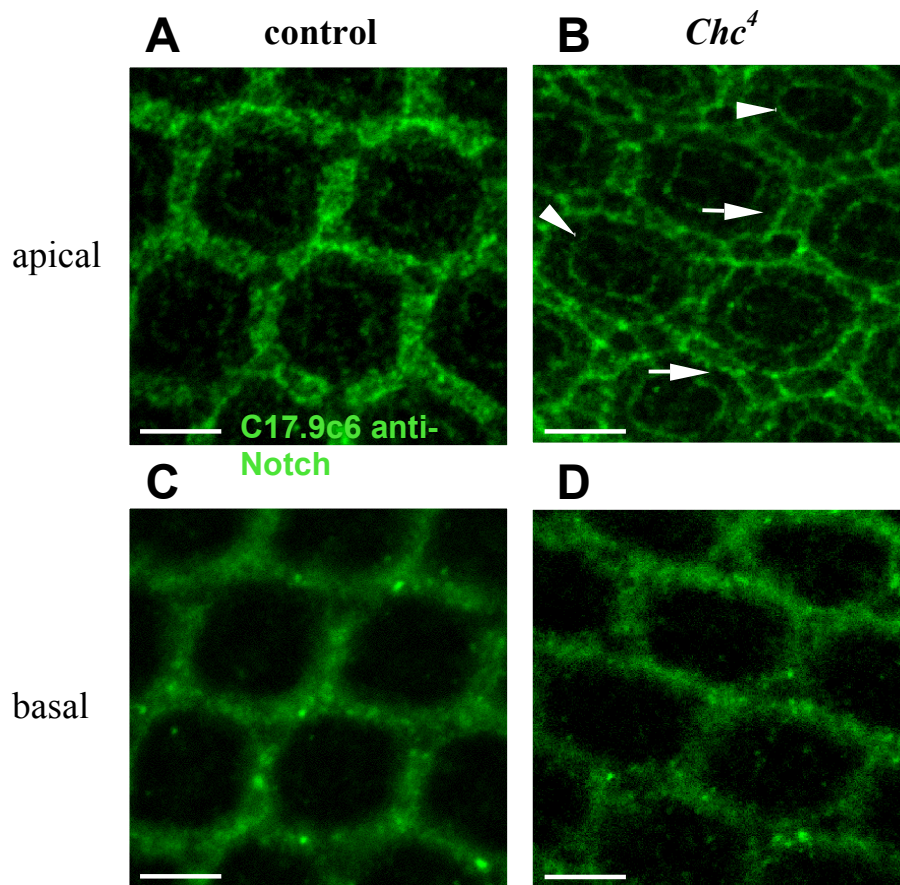


Figura R20. El receptor Notch se localiza preferentemente en la membrana de las IOPCs en retinas *Chc⁴* al 40% de desarrollo pupal. Secciones confocales apicales (**A** y **B**) y basales (**C** y **D**) de retinas del 40% de desarrollo teñidas con un anticuerpo contra la región intracelular de Notch. **A.** y **C.** Control (*Oregon R*). El receptor se localiza fundamentalmente en las IOPCs de forma difusa. **B.** En la zona apical del mutante (*cho² Chc⁴*), el receptor se localiza principalmente en los contactos entre las IOPCs (flechas) y en menor medida entre las PPCs y CCs (puntas de flecha). **D.** En la zona basal del mutante (*cho² Chc⁴*), no se observaron diferencias significativas con el control. Barras 10 μ m.

6.3. Alteraciones en Notch son suficientes para provocar la muerte de las células pigmentarias de la retina.

Los experimentos anteriores indican la posibilidad de que las alteraciones en la señalización de Notch sean las responsables del fenotipo de muerte de IOPCs observado en los mutantes en endocitosis *Chc⁴*. Si ello fuera cierto esperaríamos poder reproducir el fenotipo de *Chc⁴* alterando los niveles de señalización de Notch en las IOPCs en ausencia de alteraciones en la endocitosis. Puesto que *Chc⁴* presenta una disminución de la capacidad endocítica (Apartado 2, Resultados), y también un incremento de Notch en la membrana apical de las IOPCs, esperaríamos que un aumento de Notch en la membrana de las IOPCs en ausencia de defectos de endocitosis produjera el mismo efecto sobre la actividad de Notch que la mutación en clatrina. Para aumentar los niveles del

receptor Notch en la membrana, hemos inducido en las células pigmentarias la expresión de UAS- N^{FL} , que produce un exceso de receptor Notch completo (Full length; Zecchini et al., 1999).

La expresión de N^{FL} en las células pigmentarias de moscas control provoca la aparición de graves defectos en la morfología de las IOPCs (Fig. R.21C), que se redondean y llenan de vacuolas como en el caso de las IOPCs de mutantes Chc^4 (Fig. R.21B). Aún más, la sola sobreexpresión de Notch provoca que las IOPCs comiencen a perder los contactos con las otras células, dejando espacios entre los omatidios (Fig. R.21C, flechas). Además, tal y como cabría esperar si Chc^4 provoca un exceso de Notch en IOPCs, la expresión de N^{FL} en las células pigmentarias del mutante provoca un claro empeoramiento del fenotipo, puesto que induce una mayor desorganización de la retina y un fenotipo más avanzado de muerte de IOPCs (Fig. R.21B y D).

Si la expresión de Notch es capaz de inducir un fenotipo similar a Chc^4 , cabe preguntarse también si una reducción de Notch sería capaz de suprimir el fenotipo en el mutante. Para contestar a esta pregunta, hemos expresado en las células pigmentarias un dominante negativo del receptor Notch (UAS- N^{ECN} ; de Celis and Bray, 1997, Brennan et al., 1999), que carece del dominio intracelular del receptor, responsable de la transducción de la señal y es por tanto incapaz de señalizar, aunque compite con el receptor endógeno por la unión al ligando (Lawrence et al., 2000). Esta forma truncada del receptor Notch ha sido caracterizada en diferentes estudios donde se comporta como un antimorfo (Baonza et al., 2000, Dominguez et al., 2004).

La expresión de dicho dominante negativo se realizó a 18° C para reducir su efecto, dado que a 25° C interfiere fuertemente con la especificación de las propias células pigmentarias. Bajo estas condiciones, la expresión de N^{ECN} en la retina de animales control, no afectaba a la viabilidad de las IOPCs, aunque se observaron ligeras alteraciones en la simetría hexagonal de los omatidios (Fig. R.21E), debido a un cierto incremento de la PCD con la consiguiente disminución del número de IOPCs. De acuerdo con lo esperable si el fenotipo de muerte de IOPCs de Chc^4 se debe a un exceso de Notch, la expresión del dominante negativo, en las células pigmentarias de animales Chc^4 , suprime completamente la muerte de las IOPCs de la retina mutante (Fig. R.21F). No solamente están presentes las IOPCs en número y disposición correcta, sino que la mutación en clatrina suprime el fenotipo causado por la expresión del N^{ECN} , de alterar la simetría de la retina por exceso de PCD (Comparar fig. R.21E y F).

Todos estos resultados indican que la mutación en clatrina provoca un exceso de función de Notch, y que su fenotipo puede ser reproducido por excesos de Notch en ausencia de la mutación. De igual manera, tanto la reducción de ese exceso es capaz de rescatar el fenotipo mutante, como el exceso en Notch causado por la mutación es capaz de rescatar un fenotipo inducido de falta de Notch.

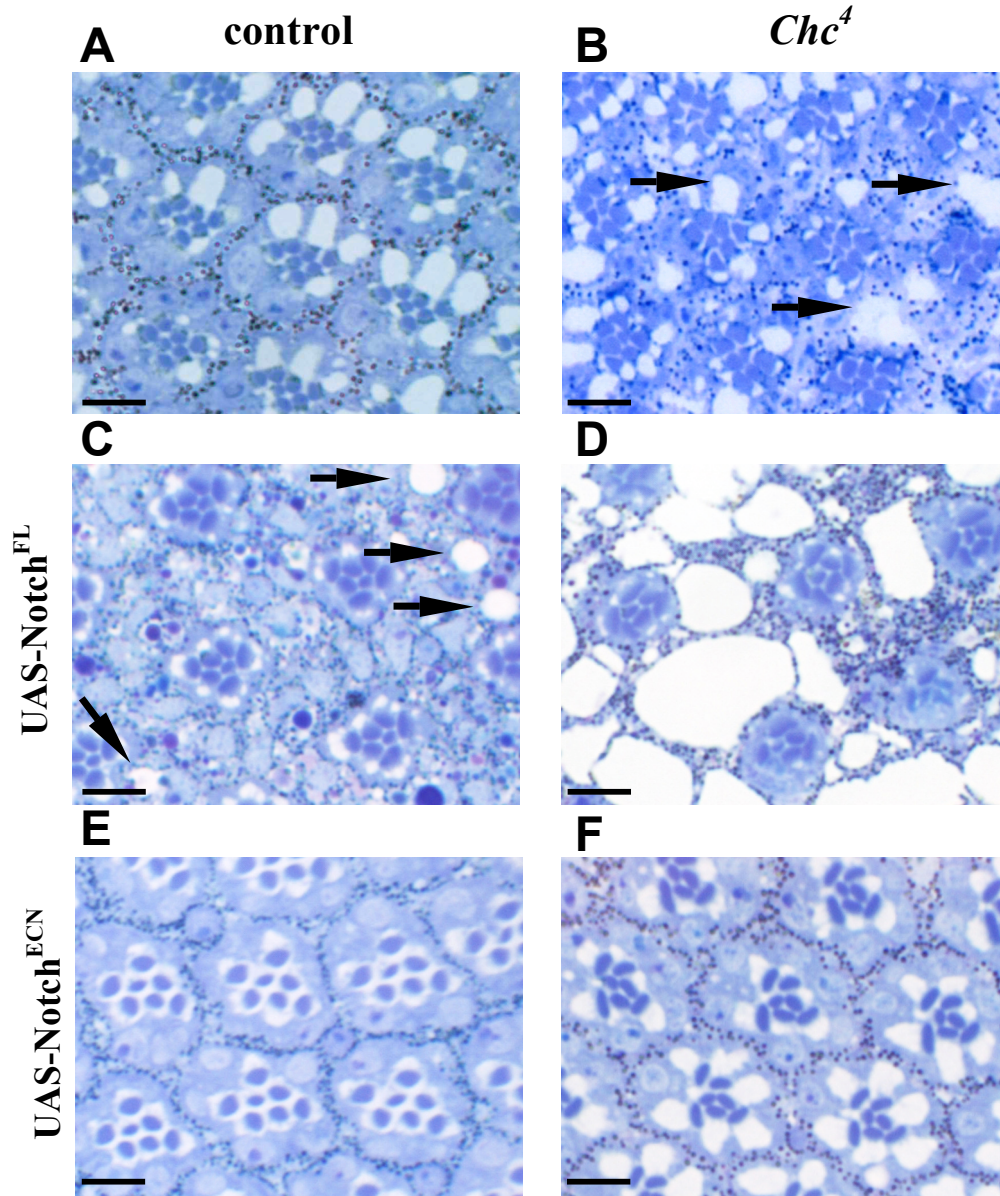


Figura R.21. El incremento del receptor Notch es necesario y suficiente para la muerte de las células pigmentarias. Secciones semifinas de ojo de 3 días en oscuridad. **A.** Control (*Oregon R*). **B.** Mutante (*Chc⁴*). **C.** La expresión de Notch en las células pigmentarias de animales control (*w*; *GAL4⁵⁴/+*; *UAS-N^{FL}/+*), induce una morfología anormal y vacuolizaciones en las IOPCs y la aparición de espacios entre omatidios (flechas). **D.** La expresión de Notch en las células pigmentarias del mutante (*y, w, Chc⁴; GAL4⁵⁴/+; UAS-N^{FL}/+*) produce un incremento y una aceleración en el fenotipo de muerte de las IOPCs. **E.** La inhibición de Notch por expresión de un dominante negativo en las células pigmentarias de animales control (*w*; *GAL4⁵⁴/ UAS-N^{ECN}*; 18° C) produce ligeras alteraciones en el alineamiento de los omatidios. **F.** La expresión del dominante negativo de Notch suprime completamente la muerte de las células pigmentarias en retinas mutantes *Chc⁴* (*y, w, Chc⁴; GAL4⁵⁴/ UAS-N^{ECN}*; 18° C). Barras 10 μ m.

7. La interacción entre *Chc*⁴ y *Notch* se mantiene en otros tejidos.

Resulta sorprendente que una mutación puntual en la cadena pesada de la clatrina, que reduce la capacidad endocítica del mutante, y que afecta también a los niveles de señalización a través de un receptor tan ampliamente utilizado en multitud de procesos como Notch, tenga en aquellos animales que alcanzan la edad adulta unos fenotipos tan específicos. Recordemos que los adultos mutantes que emergen tras la metamorfosis son aparentemente normales en morfología, lo cual parece estar en contradicción con las funciones tan generales que cumplen tanto la endocitosis como Notch. Una posible explicación está en el carácter hipomórfico de la mutación. Resulta posible que el fenotipo que hemos descubierto de muerte de IOPCs, se deba a que la endocitosis de Notch tras la PCD sea un proceso límite, donde una reducción parcial es capaz de producir efectos drásticos. Si esto es así, sería esperable que las interacciones entre *Notch* y *Chc*⁴ pudieran revelarse en otros tejidos, bajo condiciones limitantes, demostrando que el defecto en la endocitosis de Notch en el mutante *Chc*⁴ no se circunscribe a las IOPCs de la retina.

Uno de los fenotipos más característicos de falta parcial de función de Notch son las muescas que presentan los bordes de las alas de mutantes hipomórficos o de mutantes nulos en heterocigosis de Notch, y que le han proporcionado el nombre al mutante (Notch es muesca en Inglés; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Por ello, para estudiar si la endocitosis mediada por clatrina, desempeña un papel importante en la regulación de la función de Notch, en otros tejidos de *Drosophila*, hemos investigado si el fenotipo en las alas que presenta el alelo nulo, *N*^{54/9} en heterocigosis se modifica en presencia del alelo *Chc*⁴. Puesto que no es posible obtener machos *N*^{54/9}, hemos analizado las hembras trans-heterocigotas para ambas mutaciones, aprovechando que *N* es dominante y *Chc*⁴ semi-dominante.

La falta de una copia de Notch causa un fenotipo relativamente leve. Las alas presentan las venas L3 y L5 engrosadas en todas las moscas (Fig. R.22C, flechas) y los contactos de las venas con el borde de las alas suelen formar deltas en el 85% de las moscas (Fig. R.22C, asteriscos). Además el 75% de los mutantes *N*^{54/9} presentan muescas en al menos una de sus alas (Fig. R.22C, cabeza de flecha). La presencia en hembras con sólo una copia funcional de *N*, de una copia mutante de *Chc*⁴, resulta en una ligera supresión de los fenotipos del ala. Los engrosamientos de las venas L3 y L5 se hacen menos prominentes, aunque en un 70% de las moscas se sigue apreciando dicho engrosamiento (Fig. R.22D, flechas). La formación de deltas en los contactos de las venas con el borde de las alas también se hace menos prominentes (Fig. R.22D, asterisco), aunque su frecuencia apenas disminuye, pero sólo la mitad de las moscas trans-heterocigotas para ambas mutaciones presenta muescas en las alas, y éstas, cuando aparecen, son de menor tamaño.

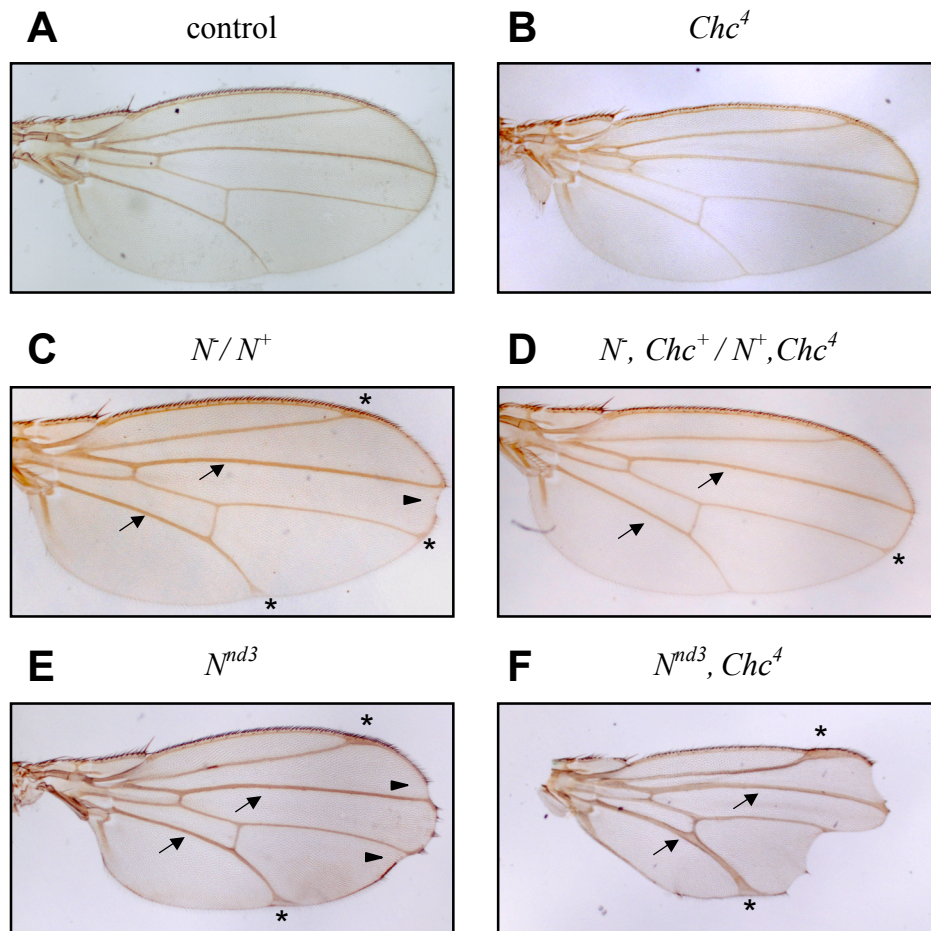


Figura R.22. *Notch* y *Chc⁴* interaccionan también en el ala. **A.** Ala control (*y, w*). **B.** Ala mutante *Chc⁴* (*y, w, Chc⁴*), que no presenta ninguna diferencia apreciable. **C.** Ala de un heterocigoto para *N* (*N^{54/9}/y, w*). Frecuentemente se observan muescas en el borde del ala (cabeza de flecha), engrosamientos de las venas del ala (flechas) y formación de deltas en los contactos de las venas con el borde alar (asteriscos) **D.** Ala de un trans-heterocigoto para la delección de *N* y el alelo *Chc⁴* (*N^{54/9}/y, w, Chc⁴*), donde no se aprecian muescas en el borde del ala, y hay una supresión parcial de las deltas, pero las venas alares siguen engrosadas. **E.** Ala de un hemocigoto para el alelo antimorfo de *N* (*N^{nd3}*), con abundantes muescas en el borde del ala (cabezas de flechas), así como engrosamientos de las venas L3 y L5 (flechas) y ensanchamientos en delta prominentes (asteriscos). **F.** Ala de un doble mutante *N^{nd3}, Chc⁴* que muestra un incremento notable de los fenotipos presentes en el alelo antimorfo de *Notch*. Obsérvese que una gran parte del ala desaparece debido a las extensas muescas, y que el engrosamiento de las venas lleva a que aparezcan desdobladas (flechas).

Para confirmar ésta interacción, hemos utilizado otro mutante de Notch, uno antimórfico denominado *N^{nd3}*. Este mutante es un cambio de sentido que da lugar a la aparición minoritaria de una forma truncada de Notch (Wesley and Saez, 2000). La cantidad de ésta forma truncada del receptor se incrementa con la temperatura, de forma que a 25° C, el mutante *N^{nd3}* en homocigosis presenta un fenotipo más prominente que a 18° C, con muescas evidentes en todas las alas (Fig. R22E, cabezas de flechas), grandes deltas (Fig. R.22E, asteriscos) y fuertes engrosamientos en las

venas L3 y L5 (Fig. R.22E, flechas). Puesto que el fenotipo de N^{nd3} se debe a la presencia de una forma tóxica de Notch en la membrana, esperaríamos que al contrario que con $N^{54/9}$, una disminución de la endocitosis incrementara el fenotipo en vez de suprimirlo, al incrementar la cantidad de forma tóxica en la membrana. Y de hecho eso es lo que observamos. El doble mutante hemicingótico para N^{nd3} y Chc^4 muestra un severo incremento del fenotipo, con muescas muy profundas que afectan a gran parte del ala, deltas grandemente expandidas (Fig. R.22F, asteriscos) y engrosamientos exagerados, que incluso llegan a afectar a L2 (Fig. R.22F, flechas).

Nuestros resultados claramente indican que una mutación puntual en la cadena pesada de la clatrina, que reduce la capacidad de endocitosis de las células del mutante, tiene como uno de sus efectos más destacados el afectar a la señalización del receptor Notch. La reducción de endocitosis produce el mismo fenotipo que un aumento en la señalización por Notch, lo que sugiere que uno de los aspectos fundamentales en la regulación de éste importante receptor es su endocitosis mediada por clatrina. Los resultados de la interacción de Chc^4 y N^{nd3} sugieren que nuestro mutante incrementa los niveles de Notch en la membrana, como también parece indicar la inmunolocalización del receptor en el mutante.

DISCUSIÓN

Discusión

La endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina es el mecanismo celular de tráfico de vesículas más empleado por los organismos eucarióticos, participando tanto en procesos de mantenimiento de la biología celular (internalización de nutrientes, antígenos, factores de crecimiento y reciclaje de receptores de membrana), como en el desarrollo de los organismos (regulación de la señalización y formación de gradientes de morfógenos) y en la transmisión sináptica (reciclaje de vesículas sinápticas; Kirchhausen, 2000a, Takei and Haucke, 2001, González-Gaitán, 2003, González-Gaitán and Stenmark, 2003).

La clatrina junto con la proteína adaptadora AP-2, es el componente mayoritario que integra las cubiertas de las vesículas recubiertas de clatrina (Mousavi et al., 2004), presente en todas las células nucleadas desde las levaduras hasta los humanos.

A pesar de la importancia tan destacada de la clatrina en los organismos multicelulares, no son muchos los estudios que se han realizado sobre su falta de función. Ello es debido, en parte, a que en metazoos los mutantes nulos en el gen de la cadena pesada de clatrina resultan letales a nivel celular. A pesar de ello, la multitud de funciones que cumple la endocitosis en el desarrollo y la señalización se han podido poner de manifiesto mediante el estudio de mutantes en otros componentes de dicho proceso, como la dinamina (Poodry et al., 1973, Kosaka and Ikeda, 1983, Poodry, 1990, De Camilli et al., 1995).

Sin embargo, el descubrimiento en 1993 de un alelo mutante no completamente letal en el gen de la cadena pesada de clatrina (Bazinet et al., 1993), abre las puertas al estudio del efecto que tiene una reducción parcial a nivel general en la endocitosis mediada por clatrina sobre los múltiples procesos de señalización que tienen lugar a lo largo del desarrollo y en el funcionamiento del organismo.

Nosotros nos hemos propuesto estudiar en un órgano modelo, la retina, de un organismo modelo, *Drosophila*, el efecto que sobre su desarrollo, mantenimiento y función tiene la mutación *Chc⁴*. Dada la aparente normalidad morfológica que presentan los mutantes supervivientes *Chc⁴*, sólo se han realizado dos estudios sobre él en los últimos 15 años (Bazinet et al., 1993, Fabrizio et al., 1998). Por ello ha sido necesario caracterizar la mutación a nivel molecular y celular antes de abordar sus efectos sobre la retina y su desarrollo.

Caracterización molecular y celular de la mutación *Chc⁴*.

El gen *Chc* de *Drosophila* es relativamente grande (27,4 Kb), contiene 8 exones, y el mutágeno empleado para la generación del alelo *Chc⁴*, EMS, produce principalmente alteraciones de un sólo nucleótido. Por cuestiones de eficiencia decidimos secuenciar únicamente las regiones codificantes del gen, en las que encontramos 13 polimorfismos silenciosos, dos polimorfismos a nivel de aminoácido y un cambio de aminoácido que estaba presente únicamente en la línea mutante (Apartado 1.1, Resultados). Este cambio consiste en la sustitución de una Alanina, muy conservada entre especies, en posición 1082 por un Treonina (Tabla R.2). El aminoácido Ala1082 se localiza en la región de la molécula que separa la “pata distal” de la “pata proximal”, denominada “rodilla” (Smith et al., 1998). Se ha postulado que esta región de la molécula está libre de interacciones con otras proteínas y que sería la responsable de la mayor parte de la flexibilidad que presentan las moléculas de CHC en la formación de las cubiertas de las vesículas (Musacchio et al., 1999, Fotin et al., 2004).

Para demostrar que el cambio de aminoácido específico de *Chc⁴* es responsable de la mutación, hemos recurrido a reintroducirlo mediante transgénesis en moscas para ensayar su capacidad de rescatar el fenotipo mutante. Para ello hemos realizado dos construcciones de clatrina que se diferencian exclusivamente en que *Chc^{A1082T}* lleva una Treonina en posición 1082 en vez de la Alanina de *Chc^{wt}*. Sin embargo esta única diferencia a nivel de secuencia conlleva una diferencia a nivel de función muy importante: mientras que *Chc^{wt}* es capaz de rescatar en gran medida la letalidad inducida por la mutación *Chc⁴*, utilizando dos promotores distintos, *Chc^{A1082T}* no rescata la mutación *Chc⁴* (Fig. R.5). *Chc^{A1082T}* falla también en rescatar los fenotipos de neurodegeneración retinal (Fig. R.8) y de muerte de células pigmentarias (Fig. R.11), a diferencia de la construcción control. Además, *Chc^{A1082T}* es capaz de reproducir el carácter semi-dominante de la mutación *Chc⁴*, induciendo parcialmente el fenotipo de muerte de células pigmentarias cuando se expresa en retinas control (Fig. R.12).

Todos estos resultados indican que el cambio de Alanina por Treonina en posición 1082 identificado en el mutante *Chc⁴*, es responsable de la mutación.

Es posible que la introducción de una aminoácido polar, de mayor masa molecular y susceptible de ser fosforilado en esta región, altere sus propiedades, pudiendo repercutir en cambios en la flexibilidad de la molécula. Puesto que se piensa que dicha flexibilidad es importante en los procesos de curvatura de la membrana durante la formación de la vesícula, y en la capacidad de ensamblaje y desensamblaje de la cubierta, la mutación podría afectar a la cinética de dichos procesos. La identificación de la mutación responsable de *Chc⁴* abre las puertas a realizar estudios estructurales con el mutante, para determinar si existen cambios de conformación en la molécula que

podieran explicar el fenotipo del mutante en endocitosis y aclarar la importancia de esta región en la molécula de clatrina.

Uno de los problemas que nos hemos encontrado en el análisis de la mutación *Chc*⁴ es la gran variabilidad de penetración que presentan algunos de sus fenotipos. En el caso de la subletalidad, el 80% de los mutantes hemicigóticos mueren a lo largo de todas las fases del desarrollo (Bazinet et al., 1993), pero en torno a un 20% a 18° C, emergen de la metamorfosis con un aspecto y un comportamiento aparentemente normal. Esta variabilidad se complica cuando se observa que la expresión de clatrina silvestre en animales control induce una fuerte letalidad, y que distintas líneas transgénicas presentan diferencias grandes de letalidad. Una posible explicación a una respuesta tan variable a los niveles de clatrina silvestre o mutante podría estar en la formación de complejos estequiométricos entre la cadena pesada y la ligera, entre cadenas pesadas para formar el trisquelión y en su asociación con proteínas adaptadoras y reguladoras para llevar a cabo su función endocítica. Incrementos o disminuciones locales o generales de la cantidad de cadena pesada o de su funcionalidad, pueden resultar en una variabilidad intrínseca en la respuesta fenotípica de los organismos.

Esta variabilidad alcanza su máximo exponente al utilizar diferentes promotores para expresar nuestras construcciones. Así, el uso de promotores ubicuos de alto nivel de expresión, como el del gen de la *tubulinaP* o de la *actina5C*, resultaban en letalidad, más penetrante para la clatrina control que para la mutante (Apartado 1.2, Resultados). El uso de otros promotores como el del gen *armadillo* o *Hsp70* permitió solventar esta limitación, al no inducir letalidad.

El carácter de la mutación *Chc*⁴ siempre ha sido particular. Mientras que mutaciones nulas en el gen *Chc* se rescatan completamente con la introducción de una copia salvaje, *Chc*⁴ no lo hace, mostrando un carácter semi-dominante (Bazinet et al., 1993). Para aclarar la naturaleza de la mutación, hemos realizado un ensayo funcional en los nefrocitos o células de Garland de la larva de tercer estadio. En dicho ensayo hemos determinado que los mutantes hemicigóticos *Chc*⁴ presentan una reducción de la capacidad endocítica del 50%, indicando que *Chc*⁴ es una mutación hipomórfica (Fig. R.7). La causa por la que una mutación hipomórfica presenta a su vez un efecto dominante negativo (Fig. R.12; Bazinet et al., 1993), podría radicar en la propiedad multimérica de la clatrina. La presencia de proteínas mutantes y silvestres daría lugar a trisqueliones y cubiertas mixtas que pueden resultar en una capacidad endocítica disminuida con respecto a animales control.

A pesar de la reducida capacidad endocítica de *Chc*⁴, un bajo porcentaje de individuos mutantes completan el desarrollo y alcanzan el estadio adulto. La morfología de estos individuos, aparentemente normal, indicaría que en dichos supervivientes los procesos del desarrollo que dan lugar al individuo adulto han cumplido los mínimos de viabilidad. No obstante algunos procesos

como la espermatogénesis (Fabrizio et al., 1998) y sistemas como la retina (Fig. R.8 y R.10) están particularmente afectados. En este estudio, hemos empleado el mutante *Chc⁴* para analizar los requerimientos de la endocitosis durante el desarrollo de la retina de *Drosophila*, un sistema muy estudiado, donde los procesos de señalización que determinan los tipos celulares suceden secuencialmente en el tiempo (Freeman, 1996, Voas and Rebay, 2004).

Caracterización del fenotipo retiniano de *Chc⁴*.

Tradicionalmente, el estudio del desarrollo del ojo compuesto de *Drosophila* se ha basado en búsquedas exhaustivas de mutantes que afectaran a su morfología externa. Centenares de éstas búsquedas han fallado en identificar alelos del gen *Chc* como modificadores de la morfología externa del ojo. El alelo *Chc⁴* fue identificado en el 1993 y nadie ha investigado si su retina presenta alteración alguna. Ello se debe fundamentalmente a que los ojos de los mutantes *Chc⁴* presentan una morfología externa aparentemente normal (Fig. R.18B).

En nuestra investigación sobre la posible implicación de mutaciones en clatrina en procesos neurodegenerativos, hemos analizado la retina de los mutantes *Chc⁴*. Para nuestra sorpresa, dada la aparente normalidad de los animales que sobreviven a la mutación, la retina de un adulto hemicigótico para el alelo *Chc⁴* crecido en condiciones estándar es un completo desastre. La degeneración retiniana inducida por la mutación afecta los dos tipos celulares más abundantes de la retina, los fotorreceptores y las células pigmentarias (Fig. R.8C y R.10.I) y el resultado es una retina completamente desorganizada y en la que mueren la mayor parte de las células.

La muerte de los fotorreceptores se produce sólo bajo condiciones de iluminación, mientras que en oscuridad permanente se mantienen viables y funcionales (Fig. R.8 y J. Vinós sin publicar). Este proceso neurodegenerativo dependiente de iluminación, transcurre mediante mecanismos apoptóticos que cursan con activación de caspasas, y puede prevenirse mediante la expresión de una proteína anti-apoptótica, p35 (Fig. R.9).

Dos datos indican que la muerte de los fotorreceptores se debe a alteraciones en la endocitosis de los mutantes. En primer lugar una reducción secundaria en la cantidad de esfingolípidos de membrana que produce un incremento de los niveles de endocitosis (Acharya et al., 2003) es capaz de suprimir el fenotipo mutante (Fig. R.9D). Por otra parte, la muerte de los fotorreceptores se debe a la presencia de la mutación puntual en la cadena pesada de la clatrina, puesto que la expresión de una clatrina control en fotorreceptores mutantes es capaz de rescatar el fenotipo de neurodegeneración, mientras que la expresión de una clatrina mutante no produce el mismo nivel de rescate (Fig. R.8). El reducido grado de rescate observado al expresar la clatrina

mutante podría deberse a una disminución del fenotipo al incrementarse la cantidad de clatrina parcialmente funcional, tal y como indica el carácter hipomórfico de la mutación *Chc⁴*.

A diferencia de las neuronas fotorreceptoras, la muerte de las células pigmentarias interomáticas (IOPCs) es un proceso independiente de la actividad de la retina, y sucede incluso cuando se mantiene a las moscas en oscuridad (Fig. R.10E-J). Curiosamente, la pérdida de las IOPCs no parece tener un efecto detectable sobre la viabilidad de las neuronas del omatidio, que en ausencia de iluminación se mantiene viables y morfológicamente normales. Aún más, cuando se rescata específicamente la muerte neuronal mediante la expresión de la construcción *Chc^{wt}* en neuronas, pero no en IOPCs, en condiciones de iluminación las neuronas mantienen su viabilidad (Fig. R.8D). Estos resultados demuestran que las neuronas no mantienen con las células pigmentarias de la retina el mismo tipo de dependencia funcional que se observa en la retina de vertebrados (Martinez-Morales et al., 2004, Strauss, 2005).

El fenotipo de muerte de IOPCs transcurre de forma progresiva en los individuos hemicigóticos para la mutación *Chc⁴*, pero ya en el momento de la eclosión y las horas posteriores, es posible apreciar que la retina presenta importantes defectos en su organización (Fig. R.10E). Las IOPCs pierden el contacto con las neuronas y se retraen, creando espacios entre los contactos entre neuronas (Fig. R.10F-G). El proceso de reabsorción de las IOPCs continúa durante días hasta su total desaparición de la retina (Fig. R.10H-J). El resultado es la pérdida de la orientación regular de los rabdomeros, con lo que se previene la formación de imágenes retinianas por superposición neuronal.

La muerte de las IOPCs en el mutante *Chc⁴* esta causada por la mutación puntual de Alanina 1082 a Treonina en la cadena pesada de la clatrina. La expresión de la clatrina control en las células pigmentarias (Fig. R.11C) o en todo el individuo (Fig. R.11E), rescata el fenotipo mutante, mientras que si se expresa la construcción mutante (Fig. R.11D y F) no se consigue rescatar la muerte de las IOPCs.

Chc⁴ es también un alelo semi-dominante para la muerte de IOPCs, presentando los animales heterocigotos un fenotipo mutante menos marcado (Fig. R.12B). Dada la función de la clatrina, una posible explicación es que la presencia de una parte de moléculas mutantes sea capaz de reducir la capacidad endocítica celular, al formarse vesículas cubiertas mixtas de moléculas silvestres y mutantes. En cualquier caso cabría esperar que la expresión de moléculas mutantes en una animal control, fuera capaz de inducir un fenotipo similar al del heterocigoto, si se alcanzara un nivel de expresión lo suficientemente fuerte.

El promotor de células pigmentarias GAL⁵⁴ no fue capaz de inducir el fenotipo al expresar la construcción mutante, posiblemente por no alcanzar un nivel de expresión suficiente, sin embargo la

expresión de proteína mutante con los promotores *Hsp70* y *tubP* si fue capaz de inducir un fenotipo parcial (Fig. R.12F y H) demostrando que la expresión de clatrina mutante en animales control produce un fenotipo de muerte de IOPCs similar al que presenta el alelo *Chc*⁴ en heterocigosis. Estos resultados demuestran que el cambio de Alanina 1082 a Treonina encontrado en el alelo *Chc*⁴ es responsable del fenotipo de muerte de IOPCs en la retina mutante.

Si bien la muerte de los fotorreceptores se produce por mecanismos de apoptosis que pueden prevenirse por inhibición de caspasas, la muerte de las IOPCs no puede evitarse con la supresión de caspasas. La expresión de los inhibidores de caspasas p35 (Fig. R.13) y DIAP1 (Fig. R.14) no fue capaz de evitar la muerte de las IOPCs, que según indicios morfológicos podría tener lugar por autofagia (Fig. R.13F). Este resultado de nuevo resalta las diferencias de fenotipo entre fotorreceptores e IOPCs.

En conclusión, la mutación *Chc*⁴ induce dos fenotipos claramente diferenciados en la retina de *Drosophila*. En primer lugar, e independientemente de las condiciones de luz, se produce un proceso de muerte de IOPCs. La muerte de éstas células pigmentarias transcurre en condiciones de inhibición de apoptosis, y comienza antes de la eclosión del animal adulto. Por otra parte, tiene lugar de manera dependiente de la iluminación, la muerte de las neuronas fotorreceptoras mediante un mecanismo de apoptosis dependiente de caspasas. Ambos procesos conjuntamente dan lugar a una completa degeneración retiniana, pero son separables en el tiempo, condiciones y mecanismos, y por ello independientes uno de otro. Puesto que la muerte de IOPCs comienza durante el desarrollo de la retina, un proceso muy estudiado, nos hemos planteado investigar las causas por las que ésta población celular es particularmente sensible a una mutación que reduce la capacidad endocítica mediada por clatrina.

Efectos de la mutación *Chc*⁴ sobre el desarrollo de la retina.

A través de numerosos estudios, se conoce que la endocitosis mediada por clatrina juega un papel primordial en el desarrollo del ojo (Cagan et al., 1992, Parks et al., 1995, Cooper and Bray, 1999, Fanto and Mlodzik, 1999, Parks et al., 2000, Baonza and Freeman, 2001, Stewart, 2002). Sin embargo, el análisis del ojo adulto del mutante *Chc*⁴, muestra que la especificación de los ocho fotorreceptores y su rotación ha sido correcta, y que las células pigmentarias y del cono también se especifican, produciendo los pigmentos y las lentes del ojo. Consistentemente con este hallazgo, que indicaría que el mutante *Chc*⁴ posee suficiente función de clatrina como para completar la especificación de todos los tipos celulares de la retina, y su correcta distribución, no hemos encontrado ninguna diferencia entre las retinas del mutante *Chc*⁴ y las de animales control durante el desarrollo larvario (Fig. R.15).

En el momento de comenzar la metamorfosis, todos los omatidios de la retina cuentan con 8 neuronas y 4 CCs y están rodeados por un grupo de células de las que se determinarán 2 PPCs y una media de 4 IOPCs por omatidio. Las demás células sobrantes son eliminadas por un proceso de PCD que tiene lugar entre las 26-36 h del desarrollo pupal a 25° C (Wolff and Ready, 1991).

Puesto que el mutante emerge de la metamorfosis sufriendo un proceso de muerte de células interomatifidiales, una posibilidad evidente es que una desregulación de la PCD que elimina las células sobrantes diera lugar al fenotipo de IOPCs. El análisis de la PCD con tinción de Naranja de Acrídina, elimina sin embargo dicha posibilidad. La PCD en el mutante *Chc⁴* es similar en intensidad y afecta a la retina entre el 25-30% del su desarrollo pupal como la PCD de animales control (Fig. R.16).

Un análisis más detallado de la retina pupal mutante, muestra que, de hecho, la PCD es algo menos efectiva en el mutante *Chc⁴* en eliminar las células sobrantes. Este fenotipo, como es característico en la mutación *Chc⁴*, es dependiente de temperatura, y a 25° C se observa en las retinas mutantes un exceso del 12,5 % de IOPCs (Fig. R.17).

Puesto que la determinación de las IOPCs y la PCD son los últimos cambios celulares que tienen lugar en el desarrollo de la retina, que a partir de entonces se limita a sufrir un proceso de maduración, podemos decir que en el desarrollo de la retina de *Chc⁴* no sólo no hay un defecto de células, sino que se produce, en función de las condiciones, un ligero exceso. Exceso que se manifiesta durante la secreción de la lente e una ligera irregularidad de las facetas y en la desorganización de algunas quetas (Fig. R.18).

A pesar de haber sido estudiada durante 15 años (Wolff and Ready, 1991, Rusconi et al., 2000), los mecanismos que regulan la PCD en la retina de *Drosophila* no son todavía bien conocidos. Se postula la existencia de dos señales contrapuestas que actuarían sobre las células precursoras de IOPCs: mientras que la vía de señalización mediada por el receptor EGFR y la proteína Ras inducirían la señal de vida requerida para la supervivencia de las IOPCs (Miller and Cagan, 1998, Sawamoto et al., 1998, Freeman and Bienz, 2001), el receptor Notch se requeriría para que tenga lugar la muerte de las células sobrantes (Cagan and Ready, 1989b, Reiter et al., 1996, Miller and Cagan, 1998, Cordero et al., 2004). Puesto que incrementos en la tasa endocítica en *Drosophila* regulan negativamente las vías mediadas por EGFR y Notch (Weber et al., 2003), la reducción observada en la PCD en retinas mutantes podría deberse a un incremento en la señalización anti-apoptótica mediada por EGFR, debido a la reducida capacidad endocítica que presentan los mutantes *Chc⁴*. Esta interpretación de los resultados sería consistente, además, con el hecho de que durante la PCD la señalización mediada por EGFR predomina sobre la de Notch por encontrarse por debajo de éste en la cascada de señalización, y si ambas vías estuvieran aumentadas

el efecto observado sería el mismo que cuando únicamente estuviera incrementada la vía del receptor de EGF (Yu et al., 2002).

Si bien un incremento de señalización en las vías del EGFR y Notch debido a una reducción de endocitosis en el mutante *Chc⁴* es consistente con el fenotipo de inhibición de la PCD retina, la implicación del EGFR en el fenotipo de muerte de IOPCs sería contradictoria con la actividad de dicho receptor en la retina pupal de *Drosophila*. Los estudios de Freeman y Bienz (Freeman and Bienz, 2001) han demostrado que la actividad protectora del EGFR en la retina pupal cesa poco tiempo después de la PCD. Por ello nos hemos planteado la posibilidad de que un exceso de Notch unido a la desaparición del EGFR puedan ser responsables de la muerte de las IOPCs.

Implicación del receptor Notch en el fenotipo de muerte de IOPCs.

En *Drosophila*, el receptor Notch es endocitado por la vía dependiente de dinamina (Le Borgne et al., 2005). Curiosamente, la endocitosis de Notch y de su ligando Delta se requieren tanto en la célula que expresa el ligando, como en la que expresa el receptor, para que haya señalización a través de la vía (Poodry, 1990, Seugnet et al., 1997). De manera contrapuesta, la endocitosis del receptor vacío puede reducir la cantidad de receptor en la membrana, dirigiéndolo hacia la vía degradativa dependiente de Hrs (Jekely and Rorth, 2003, Sakata et al., 2004, Wilkin et al., 2004) o hacia la vía de reciclaje (Hori et al., 2004).

A pesar de que la endocitosis de Notch se requiere simultáneamente para la señalización y su atenuación, estudios con un mutante de la biosíntesis de fosfolípidos, cuyo efecto es incrementar la capacidad endocítica, indicarían que un aumento de la endocitosis reduce la señalización (Weber et al., 2003).

Si como decíamos más arriba, existe la posibilidad de que un exceso de Notch sea responsable de la muerte de IOPCs, cabría esperar una interacción genética entre mutantes de *N* y *Chc⁴*. En completo acuerdo con esta hipótesis, la eliminación de Notch en la retina mutante *Chc⁴*, utilizando un alelo específico de ojo *N^{fa-g62}* (Fig. R.19D), o un alelo sensible a temperatura, a la temperatura restrictiva tras la PCD (Fig. R.19F) provocan una completa supresión del fenotipo de muerte de IOPCs del mutante *Chc⁴*.

Este resultado demuestra que la muerte de las células pigmentarias, causada por el déficit en endocitosis, requiere del receptor Notch, e implica a defectos en su endocitosis como probable causa del fenotipo.

Puesto que Notch no tiene un papel asignado en el desarrollo y maduración de la retina tras la PCD, dado que es prescindible (Cagan and Ready, 1989b), y puesto que tras la PCD el EGFR deja de ejercer su actividad protectora sobre la retina (Freeman and Bienz, 2001), cabe pensar que tras la

PCD, en la que los niveles de Notch participan en designar a las células que deben morir (Rusconi et al., 2000), el receptor deba reducir sus niveles de señalización para permitir la supervivencia y maduración de las IOPCs. Un retraso en dicha reducción producido por una disminución significativa en la capacidad endocítica de las IOPCs podría impedir su supervivencia y/o maduración, provocando el fenotipo observado en la retina de los mutantes *Chc⁴*, una muerte de IOPCs fenotípicamente diferente de la PCD.

Estudios anteriores (Reiter et al., 1996) , muestran que tras la PCD se observa un cambio en la localización del receptor Notch en las membranas apicales, donde tiene lugar la señalización. En torno al 40% del desarrollo pupal, Notch pasa de estar asociado principalmente a la membrana, a localizarse fundamentalmente a nivel intracelular. Nuestros resultados muestran que en la zona apical de la retina del mutante al 40% del desarrollo pupal, Notch sufre un cambio en su localización subcelular. Mientras que en retinas control el receptor se localiza fundamentalmente en el citoplasma (Fig. R.20A), tanto a nivel apical como basal, en la retina mutante se observa todavía una prominente inmunolocalización asociada a la membrana de las IOPCs a nivel apical (Fig. R.20B), mientras que la localización basal no muestra diferencias apreciables con el control.

Por lo tanto, no sólo se requiere Notch para que se produzca la muerte de IOPCs en el mutante en clatrina, sino que además se observa un cambio en su localización intracelular.

Si el fallo en traslocar a Notch de la membrana de las IOPCs resulta en un incremento de su actividad, cabría pensar que la muerte de IOPCs no se debe a la reducción de la endocitosis, sino al incremento de señalización de Notch tras la PCD que ésta provoca.

Una importante predicción de esta hipótesis es que un incremento en la actividad de Notch en ausencia de defectos en la endocitosis, debería ser la capaz de causar la muerte de las IOPCs. Esta predicción se cumple cuando expresamos un exceso del receptor completo, N^{FL} , en las células pigmentarias de animales control (Fig. R.21C), lo que provoca la aparición de un fenotipo idéntico al de *Chc⁴*. Aún más, el incremento de los niveles de Notch en el mutante induce un sensible empeoramiento del fenotipo (Fig. R.21D), mientras que la expresión de una forma dominante negativa del receptor, N^{ECN} , suprime el fenotipo mutante completamente.

Nuestros resultados demuestran que uno de los fenotipos principales de la retina del mutante *Chc⁴* se debe a una reducción en la capacidad de endocitar el receptor Notch, lo que resulta en un exceso de señalización a través de dicha vía, de consecuencias drásticas.

Cabe sin embargo preguntarse hasta que punto el incremento de señalización a través de Notch en el mutante *Chc⁴* es un fenómeno general de la regulación de los niveles del receptor, cuyo fenotipo se manifiesta de forma drástica en la retina, debido a constituir un tejido especialmente

sensible a dicho incremento, o si por el contrario, se trata de un fenómeno específico de las células pigmentarias de la retina, sin aplicación general a otros procesos de señalización a través de Notch.

Para comprobar si la capacidad de regulación del receptor Notch se encuentra disminuida a nivel general, hemos utilizado el fenotipo más característico de los mutantes con pérdida de función Notch: las muescas en las alas que dan nombre a la mutación (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

Moscas con la mitad de función Notch, presentan un fenotipo alar de penetración variable caracterizado por engrosamiento de algunas venas alares, formación de deltas en la unión de las venas con el borde alar, y aparición de muescas en el extremo del ala (Fig. R.22C). Las alas de moscas *Chc⁴* no presentan diferencias con los controles (Fig. R.22B), sin embargo la presencia de una copia *Chc⁴* del gen, unida a la ausencia de una copia de Notch, provocan una disminución significativa de los fenotipos alares de Notch (Fig. R.22D), lo que sería consistente con un incremento en la actividad de Notch en presencia de la mutación, incluso en heterocigosis, debido a su carácter semi-dominante.

Hemos estudiado también el efecto de la mutación en hemicigosis sobre un alelo antimorfo, sensible a temperatura de Notch, *N^{nd3}*. Este alelo es viable en hemicigosis, y a 25° C produce una forma truncada de Notch que interfiere con la función del receptor, presentando un fenotipo alar prominente, de alta penetración (Fig. R.22E; Wesley and Saez, 2000).

A diferencia del mutante de pérdida de función, cabría esperar que un defecto en la endocitosis en *N^{nd3}* produjera un incremento del receptor antimórfico truncado, incrementado el fenotipo, y eso es precisamente lo que se observa (Fig. R.22F).

Estos resultados por lo tanto demuestran que el efecto de la reducción de la endocitosis sobre la señalización de Notch es general, aunque el grado de reducción haga que incida particularmente sobre procesos como la supervivencia y maduración de las IOPCs, donde la señalización por Notch se convierte en paso decisivo, y donde cambios relativamente pequeños dan lugar a un fenotipo drástico.

Nuestros resultados tienen importancia a varios niveles. Por una lado hemos identificado la causa de la mutación *Chc⁴* en un cambio de aminoácido en una región de la molécula implicada en su flexibilidad y adaptabilidad a conformaciones planas y curvas de la cubierta. También hemos medido el efecto que sobre la endocitosis tiene dicha mutación, a nivel de fisiología celular. Hemos identificado y estudiado los distintos fenotipos que la mutación produce en el desarrollo y funcionamiento de la retina, y los procesos por los que produce la muerte de las células de la retina. Por último, hemos identificado que la causa de uno de estos fenotipos es un incremento en la señalización a través de Notch provocado por un defecto a la hora de endocitar el receptor de la membrana. Es importante destacar que aunque se había demostrado la endocitosis de Notch

dependiente de dinamina en *Drosophila* (Chen et al., 1991, van der Blik and Meyerowitz, 1991), nuestro estudio constituye la prueba más contundente de la endocitosis de Notch mediada por clatrina en *Drosophila*. Por último, aunque se han realizado numerosos estudios que demuestran que Notch puede ser endocitado y dirigido hacia la vía degradativa o de reciclado (Fehon et al., 1990, Jekely and Rorth, 2003, Wilkin et al., 2004, Hori et al., 2004), la importancia que esta endocitosis pudiera tener en la regulación de la señalización de Notch era hipotética. Nuestro estudio es el primer caso en que se muestra que alteraciones en los niveles de endocitosis repercuten sobre la señalización de Notch *in vivo*, indicando que la endocitosis del receptor es de hecho una forma de regulación de la fuerza de la señal a través de la vía de señalización.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Hemos identificado un cambio de aminoácido de Alanina a Treonina en la posición 1082 de la molécula de la cadena pesada de la clatrina presente en mutantes *Chc⁴* y ausente en animales control.
2. El cambio de Alanina 1082 por Treonina es responsable de la mutación *Chc⁴*, dado que la expresión de CHC transgénica portadora de dicho cambio no rescata los fenotipos, mientras que su expresión en controles induce la aparición de fenotipos mutantes de *Chc⁴*.
3. La mutación *Chc⁴* reduce a la mitad la capacidad endocítica en los nefrocitos larvarios, indicando que se trata de una mutación hipomórfica.
4. La mutación *Chc⁴* induce una completa degeneración retiniana caracterizada por la muerte de las células pigmentarias intermatidiales y la neurodegeneración de los fotorreceptores.
5. El desarrollo de la retina en los mutantes *Chc⁴* es normal excepto por una inhibición parcial de la muerte celular programada que determina el número de células pigmentarias intermatidiales, provocando una ligera desorganización del ojo compuesto.
6. En las células intermatidiales del mutante *Chc⁴* se observa una alteración en la localización subcelular del receptor Notch, que tiene una presencia más persistente en la membrana apical.
7. La alteración de los niveles de Notch en las células intermatidiales del mutante *Chc⁴* es responsable de su fenotipo de muerte celular, ya que una disminución de dichos niveles suprime el fenotipo en mutantes, y un incremento de dichos niveles causa un fenotipo idéntico en animales control.
8. La reducción de endocitosis causada por la mutación *Chc⁴* provoca un incremento de la señalización a través del receptor Notch también en el ala, lo que sugiere que se trata de un fenómeno general e implica a la endocitosis dependiente de clatrina como un importante factor en la regulación de Notch.
9. La mutación *Chc⁴* provoca la neurodegeneración de los fotorreceptores de la retina de manera dependiente de la iluminación. La muerte de dichas neuronas tienen lugar por la activación de las caspasas de la vía apoptótica.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

- ACHARYA, U., PATEL, S., KOUNDAKJIAN, E., NAGASHIMA, K., HAN, X. & ACHARYA, J. K. (2003) Modulating sphingolipid biosynthetic pathway rescues photoreceptor degeneration. *Science*, 299, 1740-3.
- ADACHI-YAMADA, T., GOTOH, T., SUGIMURA, I., TATENO, M., NISHIDA, Y., ONUKI, T. & DATE, H. (1999) De novo synthesis of sphingolipids is required for cell survival by down-regulating c-Jun N-terminal kinase in *Drosophila* imaginal discs. *Mol Cell Biol*, 19, 7276-86.
- ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A., EVANS, C. A., GOCAYNE, J. D., AMANATIDES, P. G., SCHERER, S. E., LI, P. W., HOSKINS, R. A., GALLE, R. F., GEORGE, R. A., LEWIS, S. E., RICHARDS, S., ASHBURNER, M., HENDERSON, S. N., SUTTON, G. G., WORTMAN, J. R., YANDELL, M. D., ZHANG, Q., CHEN, L. X., BRANDON, R. C., ROGERS, Y. H., BLAZEJ, R. G., CHAMPE, M., PFEIFFER, B. D., WAN, K. H., DOYLE, C., BAXTER, E. G., HELT, G., NELSON, C. R., GABOR, G. L., ABRIL, J. F., AGBAYANI, A., AN, H. J., ANDREWS-PFANNKOCH, C., BALDWIN, D., BALLEW, R. M., BASU, A., BAXENDALE, J., BAYRAKTAROGU, L., BEASLEY, E. M., BEESON, K. Y., BENOS, P. V., BERMAN, B. P., BHANDARI, D., BOLSHAKOV, S., BORKOVA, D., BOTCHAN, M. R., BOUCK, J., BROKSTEIN, P., BROTTIER, P., BURTIS, K. C., BUSAM, D. A., BUTLER, H., CADIEU, E., CENTER, A., CHANDRA, I., CHERRY, J. M., CAWLEY, S., DAHLKE, C., DAVENPORT, L. B., DAVIES, P., DE PABLOS, B., DELCHER, A., DENG, Z., MAYS, A. D., DEW, I., DIETZ, S. M., DODSON, K., DOUP, L. E., DOWNES, M., DUGAN-ROCHA, S., DUNKOV, B. C., DUNN, P., DURBIN, K. J., EVANGELISTA, C. C., FERRAZ, C., FERRIERA, S., FLEISCHMANN, W., FOSLER, C., GABRIELIAN, A. E., GARG, N. S., GELBART, W. M., GLASSER, K., GLODEK, A., GONG, F., GORRELL, J. H., GU, Z., GUAN, P., HARRIS, M., HARRIS, N. L., HARVEY, D., HEIMAN, T. J., HERNANDEZ, J. R., HOUCK, J., HOSTIN, D., HOUSTON, K. A., HOWLAND, T. J., WEI, M. H., IBEGWAM, C., et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287, 2185-95.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S., RAND, M. D. & LAKE, R. J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284, 770-6.
- ASHBURNER, M., GOLIC, K. G. & HAWLEY, R. S. (2005) *A Laboratory Handbook*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BAKER, N. E. & YU, S. Y. (1997) Proneural function of neurogenic genes in the developing *Drosophila* eye. *Curr Biol*, 7, 122-32.
- BAONZA, A., DE CELIS, J. F. & GARCIA-BELLIDO, A. (2000) Relationships between extramacrochaetae and Notch signalling in *Drosophila* wing development. *Development*, 127, 2383-93.

- BAONZA, A. & FREEMAN, M. (2001) Notch signalling and the initiation of neural development in the *Drosophila* eye. *Development*, 128, 3889-98.
- BAZINET, C., KATZEN, A. L., MORGAN, M., MAHOWALD, A. P. & LEMMON, S. K. (1993) The *Drosophila* clathrin heavy chain gene: clathrin function is essential in a multicellular organism. *Genetics*, 134, 1119-34.
- BRAND, A. H., MANOUKIAN, A. S. & PERRIMON, N. (1994) Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol*, 44, 635-54.
- BRAND, A. H. & PERRIMON, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118, 401-15.
- BRENNAN, C. A. & MOSES, K. (2000) Determination of *Drosophila* photoreceptors: timing is everything. *Cell Mol Life Sci*, 57, 195-214.
- BRENNAN, K., TATESON, R., LIEBER, T., COUSO, J. P., ZECCHINI, V. & ARIAS, A. M. (1999) The abruptex mutations of notch disrupt the establishment of proneural clusters in *Drosophila*. *Dev Biol*, 216, 230-42.
- BRODSKY, F. M., CHEN, C. Y., KNUEHL, C., TOWLER, M. C. & WAKEHAM, D. E. (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 517-68.
- CAGAN, R. L., KRAMER, H., HART, A. C. & ZIPURSKY, S. L. (1992) The bride of sevenless and sevenless interaction: internalization of a transmembrane ligand. *Cell*, 69, 393-9.
- CAGAN, R. L. & READY, D. F. (1989a) The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev Biol*, 136, 346-62.
- CAGAN, R. L. & READY, D. F. (1989b) Notch is required for successive cell decisions in the developing *Drosophila* retina. *Genes Dev*, 3, 1099-112.
- CAMPBELL, S. D., DUTTARROY, A., KATZEN, A. L. & CHOVNICK, A. (1991) Cloning and characterization of the scalloped region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 127, 367-80.
- CHANG, H. C., NEWMYER, S. L., HULL, M. J., EBERSOLD, M., SCHMID, S. L. & MELLMAN, I. (2002) Hsc70 is required for endocytosis and clathrin function in *Drosophila*. *J Cell Biol*, 159, 477-87.
- CHEN, M. S., OBAR, R. A., SCHROEDER, C. C., AUSTIN, T. W., POODRY, C. A., WADSWORTH, S. C. & VALLEE, R. B. (1991) Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature*, 351, 583-6.
- CHIEN, S., REITER, L. T., BIER, E. & GRIBSKOV, M. (2002) Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*, 30, 149-51.
- CONNER, S. D. & SCHMID, S. L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37-44.
- COOPER, M. T. & BRAY, S. J. (1999) Frizzled regulation of Notch signalling polarizes cell fate in the *Drosophila* eye. *Nature*, 397, 526-30.

- CORDERO, J., JASSIM, O., BAO, S. & CAGAN, R. (2004) A role for wingless in an early pupal cell death event that contributes to patterning the *Drosophila* eye. *Mech Dev*, 121, 1523-30.
- DAVIDSON, F. F. & STELLER, H. (1998) Blocking apoptosis prevents blindness in *Drosophila* retinal degeneration mutants. *Nature*, 391, 587-91.
- DE CAMILLI, P., TAKEI, K. & MCPHERSON, P. S. (1995) The function of dynamin in endocytosis. *Curr Opin Neurobiol*, 5, 559-65.
- DE CELIS, J. F. & BRAY, S. (1997) Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development*, 124, 3241-51.
- DEMEREK, M. (1994) *Biology of Drosophila*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- DI FIORE, P. P. & DE CAMILLI, P. (2001) Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell*, 106, 1-4.
- DOMINGUEZ, M., FERRES-MARCO, D., GUTIERREZ-AVINO, F. J., SPEICHER, S. A. & BENEYTO, M. (2004) Growth and specification of the eye are controlled independently by Eyegone and Eyeless in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*, 36, 31-9.
- DRISCOLL, M. & GERSTBREIN, B. (2003) Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nat Rev Genet*, 4, 181-94.
- EFTHIMIOPOULOS, S., FLOOR, E., GEORGAKOPOULOS, A., SHIOI, J., CUI, W., YASOTHORNSRIKUL, S., HOOK, V. Y., WISNIEWSKI, T., BUEE, L. & ROBAKIS, N. K. (1998) Enrichment of presenilin 1 peptides in neuronal large dense-core and somatodendritic clathrin-coated vesicles. *J Neurochem*, 71, 2365-72.
- ELLIS, M. C., O'NEILL, E. M. & RUBIN, G. M. (1993) Expression of *Drosophila* glass protein and evidence for negative regulation of its activity in non-neuronal cells by another DNA-binding protein. *Development*, 119, 855-65.
- FABRIZIO, J. J., HIME, G., LEMMON, S. K. & BAZINET, C. (1998) Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 125, 1833-43.
- FANTO, M. & MLODZIK, M. (1999) Asymmetric Notch activation specifies photoreceptors R3 and R4 and planar polarity in the *Drosophila* eye. *Nature*, 397, 523-6.
- FEANY, M. B. & BENDER, W. W. (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 404, 394-8.
- FEHON, R. G., JOHANSEN, K., REBAY, I. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. (1991) Complex cellular and subcellular regulation of notch expression during embryonic and imaginal development of *Drosophila*: implications for notch function. *J Cell Biol*, 113, 657-69.
- FEHON, R. G., KOOH, P. J., REBAY, I., REGAN, C. L., XU, T., MUSKAVITCH, M. A. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. (1990) Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell*, 61, 523-34.

- FERNANDEZ-FUNEZ, P., NINO-ROSALES, M. L., DE GOUYON, B., SHE, W. C., LUCHAK, J. M., MARTINEZ, P., TURIEGANO, E., BENITO, J., CAPOVILLA, M., SKINNER, P. J., MCCALL, A., CANAL, I., ORR, H. T., ZOGHBI, H. Y. & BOTAS, J. (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*, 408, 101-6.
- FORTINI, M. E. (2001) Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 627-34.
- FORTINI, M. E. & BONINI, N. M. (2000) Modeling human neurodegenerative diseases in *Drosophila*: on a wing and a prayer. *Trends Genet*, 16, 161-7.
- FORTINI, M. E., REBAY, I., CARON, L. A. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. (1993) An activated Notch receptor blocks cell-fate commitment in the developing *Drosophila* eye. *Nature*, 365, 555-7.
- FOTIN, A., CHENG, Y., SLIZ, P., GRIGORIEFF, N., HARRISON, S. C., KIRCHHAUSEN, T. & WALZ, T. (2004) Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature*, 432, 573-9.
- FREEMAN, M. (1996) Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell*, 87, 651-60.
- FREEMAN, M. (1997) Cell determination strategies in the *Drosophila* eye. *Development*, 124, 261-70.
- FREEMAN, M. & BIENZ, M. (2001) EGF receptor/Rolled MAP kinase signalling protects cells against activated Armadillo in the *Drosophila* eye. *EMBO Rep*, 2, 157-62.
- GAIDAROV, I., SANTINI, F., WARREN, R. A. & KEEN, J. H. (1999) Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol*, 1, 1-7.
- GARCÍA-BELLIDO, A. & MERRIAM, J. R. (1969) Cell lineage of the imaginal discs in *Drosophila* gynandromorphs. *J Exp Zool*, 170, 61-75.
- GLOOR, G. B., PRESTON, C. R., JOHNSON-SCHLITZ, D. M., NASSIF, N. A., PHILLIS, R. W., BENZ, W. K., ROBERTSON, H. M. & ENGELS, W. R. (1993) Type I repressors of P element mobility. *Genetics*, 135, 81-95.
- GONZÁLEZ-GAITÁN, M. (2003) Signal dispersal and transduction through the endocytic pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 213-24.
- GONZÁLEZ-GAITÁN, M. & JACKLE, H. (1997) Role of *Drosophila* alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling. *Cell*, 88, 767-76.
- GONZÁLEZ-GAITÁN, M. & STENMARK, H. (2003) Endocytosis and signaling: a relationship under development. *Cell*, 115, 513-21.
- GREENE, B., LIU, S. H., WILDE, A. & BRODSKY, F. M. (2000) Complete reconstitution of clathrin basket formation with recombinant protein fragments: adaptor control of clathrin self-assembly. *Traffic*, 1, 69-75.

- GUPTA-ROSSI, N., SIX, E., LEBAIL, O., LOGEAT, F., CHASTAGNER, P., OLRÉ, A., ISRAEL, A. & BROU, C. (2004) Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *J Cell Biol*, 166, 73-83.
- GYLLENSTEN, U. B. & ERLICH, H. A. (1988) Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7652-6.
- HAY, B. A., WASSARMAN, D. A. & RUBIN, G. M. (1995) Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell*, 83, 1253-62.
- HAY, B. A., WOLFF, T. & RUBIN, G. M. (1994) Expression of baculovirus P35 prevents cell death in Drosophila. *Development*, 120, 2121-9.
- HORI, K., FOSTIER, M., ITO, M., FUWA, T. J., GO, M. J., OKANO, H., BARON, M. & MATSUNO, K. (2004) Drosophila *deltex* mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development*, 131, 5527-37.
- JACKSON, G. R., WIEDAU-PAZOS, M., SANG, T. K., WAGLE, N., BROWN, C. A., MASSACHI, S. & GESCHWIND, D. H. (2002) Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in Drosophila. *Neuron*, 34, 509-19.
- JEKELY, G. & RORTH, P. (2003) Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in Drosophila. *EMBO Rep*, 4, 1163-8.
- KEDRA, D., PEYRARD, M., FRANSSON, I., COLLINS, J. E., DUNHAM, I., ROE, B. A. & DUMANSKI, J. P. (1996) Characterization of a second human clathrin heavy chain polypeptide gene (CLH-22) from chromosome 22q11. *Hum Mol Genet*, 5, 625-31.
- KIMMEL, B. E., HEBERLEIN, U. & RUBIN, G. M. (1990) The homeo domain protein rough is expressed in a subset of cells in the developing Drosophila eye where it can specify photoreceptor cell subtype. *Genes Dev*, 4, 712-27.
- KIRCHHAUSEN, T. (2000a) Clathrin. *Annu Rev Biochem*, 69, 699-727.
- KIRCHHAUSEN, T. (2000b) Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 187-98.
- KIRCHHAUSEN, T. & HARRISON, S. C. (1984) Structural domains of clathrin heavy chains. *J Cell Biol*, 99, 1725-34.
- KOPAN, R. (2002) Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci*, 115, 1095-7.
- KORNBERG, T. B. & KRASNOW, M. A. (2000) The Drosophila genome sequence: implications for biology and medicine. *Science*, 287, 2218-20.
- KOSAKA, T. & IKEDA, K. (1983) Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of Drosophila melanogaster, *shibirets1*. *J Cell Biol*, 97, 499-507.
- KUMAR, J. P. & MOSES, K. (2001) EGF receptor and Notch signaling act upstream of Eyeless/Pax6 to control eye specification. *Cell*, 104, 687-97.

- LAI, E. C. (2004) Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*, 131, 965-73.
- LAWRENCE, N., KLEIN, T., BRENNAN, K. & MARTINEZ ARIAS, A. (2000) Structural requirements for notch signalling with delta and serrate during the development and patterning of the wing disc of *Drosophila*. *Development*, 127, 3185-95.
- LE BORGNE, R. (2006) Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 213-22.
- LE BORGNE, R., BARDIN, A. & SCHWEISGUTH, F. (2005) The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development*, 132, 1751-62.
- LECOURTOIS, M. & SCHWEISGUTH, F. (1998) Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of notch in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, 8, 771-4.
- LEE, T. & LUO, L. (1999) Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron*, 22, 451-61.
- LEMMON, S. K. & JONES, E. W. (1987) Clathrin requirement for normal growth of yeast. *Science*, 238, 504-9.
- LEMMON, S. K., PELLICENA-PALLE, A., CONLEY, K. & FREUND, C. L. (1991) Sequence of the clathrin heavy chain from *Saccharomyces cerevisiae* and requirement of the COOH terminus for clathrin function. *J Cell Biol*, 112, 65-80.
- LI, Y. & BAKER, N. E. (2001) Proneural enhancement by Notch overcomes Suppressor-of-Hairless repressor function in the developing *Drosophila* eye. *Curr Biol*, 11, 330-8.
- LIN, D. M. & GOODMAN, C. S. (1994) Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron*, 13, 507-23.
- LINDSLEY, D. L. & ZIMM, G. (1992) *The genome of Drosophila melanogaster*, San Diego, Academic Press.
- LOUVI, A. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. (2006) Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci*, 7, 93-102.
- MARKOPOULOU, K., WELSHONS, W. J. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. (1989) Phenotypic and molecular analysis of the facets, a group of intronic mutations at the Notch locus of *Drosophila melanogaster* which affect postembryonic development. *Genetics*, 122, 417-28.
- MARSH, J. L., PALLOS, J. & THOMPSON, L. M. (2003) Fly models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 2, R187-93.
- MARTINEZ ARIAS, A., ZECCHINI, V. & BRENNAN, K. (2002) CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr Opin Genet Dev*, 12, 524-33.

- MARTINEZ-MORALES, J. R., RODRIGO, I. & BOVOLENTA, P. (2004) Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays*, 26, 766-77.
- MATSUNO, K., DIEDERICH, R. J., GO, M. J., BLAUMUELLER, C. M. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. (1995) Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development*, 121, 2633-44.
- MATTSON, M. P., DUAN, W., CHAN, S. L. & CAMANDOLA, S. (1999) Par-4: an emerging pivotal player in neuronal apoptosis and neurodegenerative disorders. *J Mol Neurosci*, 13, 17-30.
- MILLER, D. T. & CAGAN, R. L. (1998) Local induction of patterning and programmed cell death in the developing *Drosophila* retina. *Development*, 125, 2327-35.
- MOLLEREAU, B., WERNET, M. F., BEAUFILS, P., KILLIAN, D., PICHAUD, F., KUHNLEIN, R. & DESPLAN, C. (2000) A green fluorescent protein enhancer trap screen in *Drosophila* photoreceptor cells. *Mech Dev*, 93, 151-60.
- MORIYAMA, E. N. & POWELL, J. R. (1996) Intraspecific nuclear DNA variation in *Drosophila*. *Mol Biol Evol*, 13, 261-77.
- MOUSAVI, S. A., MALEROD, L., BERG, T. & KJEKEN, R. (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J*, 377, 1-16.
- MUSACCHIO, A., SMITH, C. J., ROSEMAN, A. M., HARRISON, S. C., KIRCHHAUSEN, T. & PEARSE, B. M. (1999) Functional organization of clathrin in coats: combining electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Mol Cell*, 3, 761-70.
- O'HALLORAN, T. J. & ANDERSON, R. G. (1992) Clathrin heavy chain is required for pinocytosis, the presence of large vacuoles, and development in *Dictyostelium*. *J Cell Biol*, 118, 1371-7.
- PARKS, A. L., KLUEG, K. M., STOUT, J. R. & MUSKAVITCH, M. A. (2000) Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development*, 127, 1373-85.
- PARKS, A. L., TURNER, F. R. & MUSKAVITCH, M. A. (1995) Relationships between complex Delta expression and the specification of retinal cell fates during *Drosophila* eye development. *Mech Dev*, 50, 201-16.
- PAYNE, G. S. & SCHEKMAN, R. (1985) A test of clathrin function in protein secretion and cell growth. *Science*, 230, 1009-14.
- PEARSE, B. M. (1987) Clathrin and coated vesicles. *Embo J*, 6, 2507-12.
- PEARSON, W. R. & LIPMAN, D. J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 2444-8.
- PHELPS, C. B. & BRAND, A. H. (1998) Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods*, 14, 367-79.
- POODRY, C. A. (1990) shibire, a neurogenic mutant of *Drosophila*. *Dev Biol*, 138, 464-72.

- POODRY, C. A., HALL, L. & SUZUKI, D. T. (1973) Developmental properties of Shibire: a pleiotropic mutation affecting larval and adult locomotion and development. *Dev Biol*, 32, 373-86.
- POULSON, D. F. (1937) Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 23, 133-7.
- RAMOS, R. G., GRIMWADE, B. G., WHARTON, K. A., SCOTTGALE, T. N. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. (1989) Physical and functional definition of the *Drosophila* Notch locus by P element transformation. *Genetics*, 123, 337-48.
- READY, D. F., HANSON, T. E. & BENZER, S. (1976) Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol*, 53, 217-40.
- REFOLO, L. M., SAMBAMURTI, K., EFTHIMIOPOULOS, S., PAPPOLLA, M. A. & ROBAKIS, N. K. (1995) Evidence that secretase cleavage of cell surface Alzheimer amyloid precursor occurs after normal endocytic internalization. *J Neurosci Res*, 40, 694-706.
- REITER, C., SCHIMANSKY, T., NIE, Z. & FISCHBACH, K. F. (1996) Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: the role of the IrreC-rst protein. *Development*, 122, 1931-40.
- ROTH, T. F. & PORTER, K. R. (1964) Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *L.J. Cell Biology*, 20, 313-332.
- ROZEN, S. & SKALETISKY, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132, 365-86.
- RUSCONI, J. C., FINK, J. L. & CAGAN, R. (2004) klumpfuss regulates cell death in the *Drosophila* retina. *Mech Dev*, 121, 537-46.
- RUSCONI, J. C., HAYS, R. & CAGAN, R. L. (2000) Programmed cell death and patterning in *Drosophila*. *Cell Death Differ*, 7, 1063-70.
- SAKATA, T., SAKAGUCHI, H., TSUDA, L., HIGASHITANI, A., AIGAKI, T., MATSUNO, K. & HAYASHI, S. (2004) *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr Biol*, 14, 2228-36.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. (2001) *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANSON, B., WHITE, P. & VINCENT, J. P. (1996) Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature*, 383, 627-30.
- SAWAMOTO, K., TAGUCHI, A., HIROTA, Y., YAMADA, C., JIN, M. H. & OKANO, H. (1998) Argos induces programmed cell death in the developing *Drosophila* eye by inhibition of the Ras pathway. *Cell Death Differ*, 5, 262-70.
- SCHMID, S. L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem*, 66, 511-48.

- SCHNEIDER, T., REITER, C., EULE, E., BADER, B., LICHTER, B., NIE, Z., SCHIMANSKY, T., RAMOS, R. G. & FISCHBACH, K. F. (1995) Restricted expression of the *irreC-rst* protein is required for normal axonal projections of columnar visual neurons. *Neuron*, 15, 259-71.
- SCHROETER, E. H., KISSLINGER, J. A. & KOPAN, R. (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, 393, 382-6.
- SCHWEISGUTH, F. (2004) Notch signaling activity. *Curr Biol*, 14, R129-38.
- SETO, E. S., BELLEN, H. J. & LLOYD, T. E. (2002) When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev*, 16, 1314-36.
- SEUGNET, L., SIMPSON, P. & HAENLIN, M. (1997) Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev Biol*, 192, 585-98.
- SHELLENBARGER, D. L. & MOHLER, J. D. (1975) Temperature-sensitive mutations of the notch locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 81, 143-62.
- SLEPNEV, V. I. & DE CAMILLI, P. (2000) Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci*, 1, 161-72.
- SLEPNEV, V. I., OCHOA, G. C., BUTLER, M. H. & DE CAMILLI, P. (2000) Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J Biol Chem*, 275, 17583-9.
- SMITH, C. J., GRIGORIEFF, N. & PEARSE, B. M. (1998) Clathrin coats at 21 Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. *Embo J*, 17, 4943-53.
- SPRADLING, A. C. & RUBIN, G. M. (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*, 218, 341-7.
- SPREIJ, T. E. (1971) Cell death during the development of the imaginal discs of *Calliphora erythrocephala*. *Netherlands J. Zool.*, 21, 221-264.
- STAPLETON, M., LIAO, G., BROKSTEIN, P., HONG, L., CARNINCI, P., SHIRAKI, T., HAYASHIZAKI, Y., CHAMPE, M., PACLEB, J., WAN, K., YU, C., CARLSON, J., GEORGE, R., CELNIKER, S. & RUBIN, G. M. (2002) The *Drosophila* gene collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes. *Genome Res*, 12, 1294-300.
- STEWART, B. A. (2002) Membrane trafficking in *Drosophila* wing and eye development. *Semin Cell Dev Biol*, 13, 91-7.
- STRAUSS, O. (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85, 845-81.
- TAKEI, K. & HAUCKE, V. (2001) Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol*, 11, 385-91.

- TANENBAUM, S. B., GORSKI, S. M., RUSCONI, J. C. & CAGAN, R. L. (2000) A screen for dominant modifiers of the irreC-rst cell death phenotype in the developing *Drosophila* retina. *Genetics*, 156, 205-17.
- TER HAAR, E., HARRISON, S. C. & KIRCHHAUSEN, T. (2000) Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 1096-100.
- TER HAAR, E., MUSACCHIO, A., HARRISON, S. C. & KIRCHHAUSEN, T. (1998) Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker. *Cell*, 95, 563-73.
- TITTEL, J. N. & STELLER, H. (2000) A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol*, 1, REVIEWS0003.
- VAN DER BLIEK, A. M. & MEYEROWITZ, E. M. (1991) Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. *Nature*, 351, 411-4.
- VINOS, J., JALINK, K., HARDY, R. W., BRITT, S. G. & ZUKER, C. S. (1997) A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. *Science*, 277, 687-90.
- VOAS, M. G. & REBAY, I. (2004) Signal integration during development: insights from the *Drosophila* eye. *Dev Dyn*, 229, 162-75.
- WEBER, U., EROGLU, C. & MLODZIK, M. (2003) Phospholipid membrane composition affects EGF receptor and Notch signaling through effects on endocytosis during *Drosophila* development. *Dev Cell*, 5, 559-70.
- WESLEY, C. S. & SAEZ, L. (2000) Analysis of notch lacking the carboxyl terminus identified in *Drosophila* embryos. *J Cell Biol*, 149, 683-96.
- WILKIN, M. B., CARBERY, A. M., FOSTIER, M., ASLAM, H., MAZALEYRAT, S. L., HIGGS, J., MYAT, A., EVANS, D. A., CORNELL, M. & BARON, M. (2004) Regulation of notch endosomal sorting and signaling by *Drosophila* Nedd4 family proteins. *Curr Biol*, 14, 2237-44.
- WOLFF, T. (2000a) Dissection techniques. IN SULLIVAN, W., ASHBURNER, M. & HAWLEY, R. S. (Eds.) *Drosophila protocols*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- WOLFF, T. (2000b) Preparation of specimens for scanning electron microscopy. IN SULLIVAN, W., ASHBURNER, M. & HAWLEY, R. S. (Eds.) *Drosophila protocols*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- WOLFF, T. (2000c) Preparation of specimens for transmission electron microscopy. IN SULLIVAN, W., ASHBURNER, M. & HAWLEY, R. S. (Eds.) *Drosophila protocols*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- WOLFF, T. (2000d) Preparing thick sections of adult retinas. IN SULLIVAN, W., ASHBURNER, M. & HAWLEY, R. S. (Eds.) *Drosophila protocols*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- WOLFF, T. & READY, D. F. (1991) Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development*, 113, 825-39.
- WOLFF, T. & READY, D. F. (1993) Pattern formation in the *Drosophila* retina. IN BATE, M. & MARTÍNEZ ARIAS, A. (Eds.) *The development of Drosophila melanogaster*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- YBE, J. A., BRODSKY, F. M., HOFMANN, K., LIN, K., LIU, S. H., CHEN, L., EARNEST, T. N., FLETTERICK, R. J. & HWANG, P. K. (1999) Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. *Nature*, 399, 371-5.
- YBE, J. A., GREENE, B., LIU, S. H., PLEY, U., PARHAM, P. & BRODSKY, F. M. (1998) Clathrin self-assembly is regulated by three light-chain residues controlling the formation of critical salt bridges. *Embo J*, 17, 1297-303.
- YU, S. Y., YOO, S. J., YANG, L., ZAPATA, C., SRINIVASAN, A., HAY, B. A. & BAKER, N. E. (2002) A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing *Drosophila* eye. *Development*, 129, 3269-78.
- ZECCHINI, V., BRENNAN, K. & MARTINEZ-ARIAS, A. (1999) An activity of Notch regulates JNK signalling and affects dorsal closure in *Drosophila*. *Curr Biol*, 9, 460-9.
- ZHOU, L., SCHNITZLER, A., AGAPITE, J., SCHWARTZ, L. M., STELLER, H. & NAMBU, J. R. (1997) Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 5131-6.